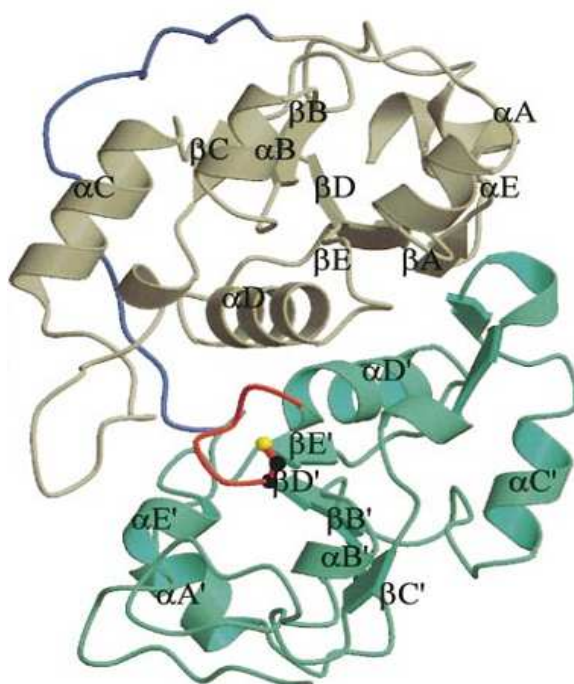


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΡΟΔΑΝΑΣΗ ΤΗΣ
PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA



ΧΟΝΔΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΡΟΔΑΝΑΣΗ ΤΗΣ
PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA**

Επιβλέπων καθηγητής: Μόσιαλος Δημήτρης

Τριμελής επιτροπή: Μόσιαλος Δημήτρης
Κοντού Μαρία
Μαρκουλάτος Παναγιώτης

ΧΟΝΔΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Μόσιαλος Δημήτρης – Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
2. Κοντού Μαρία – Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
3. Μαρκουλάτος Παναγιώτης – Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στην Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του λέκτορος κ. Μόσιαλου Δημήτρη. Η ευκαιρία για την συνεργασία με τον κ. Μόσιαλο δόθηκε από τον κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μόσιαλο Δημήτρη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς θεωρώ ότι η εργαστηριακή εμπειρία που απέκτησα καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου είναι ανεκτίμητη. Η επιστημονική του κατάρτιση και οι πολύτιμες συμβουλές και οδηγίες του, με βοήθησαν ώστε να ολοκληρώσω τις πειραματικές διαδικασίες. Χωρίς την αδιάκοπη συμπαράστασή του, την υπομονή του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Μια μεγάλη ευχαριστία στην κ. Κοντού Μαρία για την καθοδήγησή της σε ένα μεγάλο μέρος της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υποψήφια διδάκτωρ Καρούλια Ζωή για την τεράστια βοήθεια που μου πρόσφερε και για τις συμβουλές και γενικότερη υποστήριξή της, καθώς και στην Γιαννούλη Σταματίνα, Ph.D., για την καταλυτική συμμετοχή της σε πειράματα – κλειδιά της εργασίας και την πολύτιμη συμπαράστασή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κατερίνα Νικολούλη για την άψογη συνεργασία και την ηθική υποστήριξή της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*
- 1.2. Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila*
- 1.3. Δομή του γονιδιώματος του βακτηρίου *P.entomophila*
- 1.4. Παθογένεια του βακτηρίου
- 1.5. Υδροκυάνιο (HCN)
- 1.6. Μηχανισμοί αυτοπροστασίας των κυανογενετικών βακτηρίων από το τοξικό HCN
- 1.7. Σκοπός

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1. Βακτηριακά στελέχη και καλλιέργειες μικροοργανισμών
- 2.2. Ο πλασμιδιακός φορέας pET-20b(+) vector (Novagen)
- 2.3. Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων (competent cells) για ηλεκτροδιάτρηση
- 2.4. Ενίσχυση του γονιδίου της Ροδανάσης με την τεχνική της PCR.
- 2.5. Κλωνοποίηση του γονιδίου της ροδανάσης
- 2.6. Μέθοδος επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών
- 2.7. Επιβεβαίωση της επιτυχίας της κλωνοποίησης με πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες
- 2.8. Αλληλούχηση (sequencing)
- 2.9. Ενίσχυση του γονιδίου της ροδανάσης με την τεχνική της PCR, χρησιμοποιώντας νέους εκκινητές και υψηλής πιστότητας (High Fidelity) πολυμεράση
- 2.10. Καθαρισμός του προϊόντος της PCR από την πηκτή αγαρόζης
- 2.11. Κλωνοποίηση του γονιδίου της ροδανάσης
- 2.12. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

- 2.13** Αντίδραση διπλής πέψης
- 2.14** Καθαρισμός των προϊόντων των δύο πέψεων
- 2.15** Αντίδραση δεσμάσης (ligation)
- 2.16** Μετασχηματισμός κυττάρων DH5α με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)
- 2.17** Επιβεβαίωση της επιτυχίας του μετασχηματισμού
- 2.18** Αλληλούχηση
- 2.19** Μετασχηματισμός BL21(DE3) κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση
- 2.20** Προσπάθεια υπερέκφρασης της πρωτεΐνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 3.1** Ενίσχυση του γονιδίου της ροδανάσης με την τεχνική της PCR
- 3.2** Κλωνοποίηση του γονιδίου στον πλασμιακό φορέα pSC-A και επιβεβαίωση της επιτυχίας με πέψη με περιοριστικά ένζυμα
- 3.3** Αλληλούχηση (sequencing)
- 3.4** Ενίσχυση του γονιδίου της ροδανάσης με την τεχνική της PCR, με καινούριους primers και Taq πολυμεράση.
- 3.5** Κλωνοποίηση του γονιδίου της ροδανάσης
- 3.6** Αλληλούχηση (sequencing)
- 3.7** Μετασχηματισμός BL21 (DE3) κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση
- 3.8** Προσπάθεια υπερέκφρασης της πρωτεΐνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila* ανακαλύφθηκε πρόσφατα και μέχρι τώρα είναι το μόνο γνωστό μέλος του γένους *Pseudomonas* που μπορεί να μολύνει με φυσικό τρόπο την *Drosophila melanogaster* και να την οδηγήσει σε θάνατο.

Έρευνες έχουν δείξει πως η μολυσματικότητα της *Pseudomonas entomophila* είναι πολυπαραγοντική, με μια ξεκάθαρη διαφοροποίηση μεταξύ των παραγόντων που επάγουν την ανοσολογική απόκριση και αυτών που επάγουν την παθογένεια. Ένας από τους μολυσματικούς παράγοντες που πιθανόν συμβάλλουν στην εντομοπαθογένεια αυτού του βακτηρίου είναι το υδροκυάνιο (HCN).

Τα βακτηριακά στελέχη που παράγουν υδροκυάνιο και το εκκρίνουν στο περιβάλλον τους διαθέτουν επιπλέον και μηχανισμούς που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα και τους προστατεύουν από την τοξική δράση του HCN. Η μη-ευαίσθητη στο κυάνιο οξειδάση (CIO) θεωρείται το πιο αποτελεσματικό σύστημα για την προστασία του βακτηρίου από την τοξικότητα του εξωγενούς κυανίου, ενώ το ένζυμο ροδανάση (rhodanese) προστατεύει τα κυανογενετικά βακτήρια από το HCN που τα ίδια παράγουν.

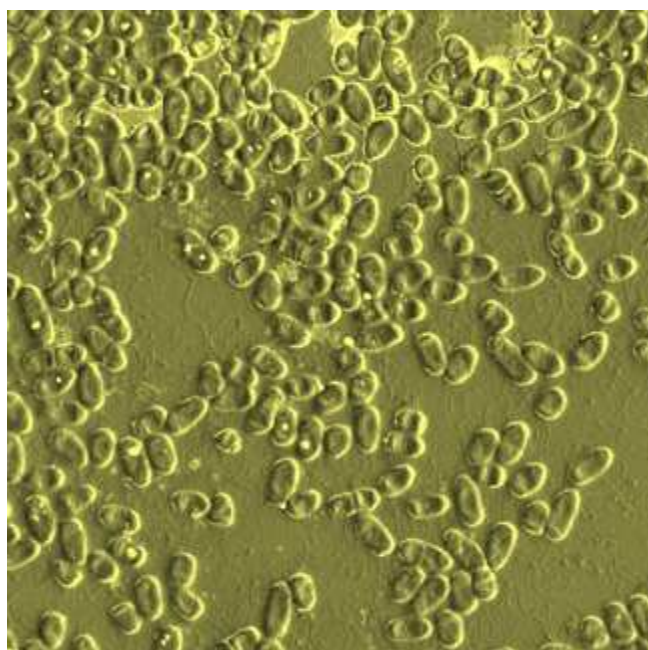
Οι ροδανάσες είναι θειοτρανσφεράσες θειοθειικού ανιόντος ($S_2O_3^{2-}$) και κυανίου. Καταλύουν την μεταφορά ενός ατόμου θείου από το θειοθειικό ανιόν στο κυάνιο, παράγοντας με αυτό τον τρόπο το λιγότερο τοξικό θειοκυάνιο.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του γονιδίου της ροδανάσης του άγριου τύπου *Pseudomonas entomophila* και έγινε προσπάθεια εύρεσης των συνθηκών της υπερέκφρασής της. Ο απώτερος σκοπός του πειράματος είναι η παραγωγή μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της, ώστε να επιβεβαιωθεί η προστατευτική για το βακτήριο δράση της.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

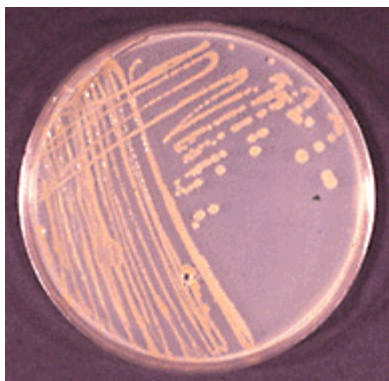
Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν ανακαλυφθεί ήδη από τον 19ο αιώνα και μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί πάνω από 230 είδη, πολλά εκ των οποίων περιλαμβάνουν και υποείδη. Ένας τύπος ψευδομονάδας είναι η *Pseudomonas aeruginosa*, το πιο γνωστό παθογόνο του γένους για τον άνθρωπο, το οποίο είναι υπεύθυνο για ένα ολοένα αυξανόμενο αριθμό νοσοκομειακών λοιμώξεων, ιδιαίτερα σε άτομα με βαριά αναστολογική ανεπάρκεια και ασθενείς με κυστική ίνωση [Garau & Gomez., 2003].



ΕΙΚΟΝΑ 1: Βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο).

Οι ψευδομονάδες είναι Gram (-) , αερόβια , ετερότροφα βακτήρια που δεν σχηματίζουν σπόρια και απαντώνται συνηθέστερα στο νερό, το έδαφος αλλά και σε ρίζες πολλών φυτών. Είναι ευθύγραμμοι ή ελαφρά κεκαμμένοι βάκιλλοι με πολικά μαστίγια. Οι διατροφικές τους ανάγκες είναι απλές, ενώ αναπτύσσονται χημειοργανοτροφικά σε ουδέτερο pH και μεσόφιλο εύρος θερμοκρασιών. Χαρακτηριστικό του μεταβολισμού τους είναι πως χρησιμοποιούν την οδό Entner-Doudoroff για τον καταβολισμό της γλυκόζης.

Κύρια χαρακτηριστικά ταυτοποίησής τους είναι η απουσία παραγωγής αερίου από γλυκόζη, καθώς και η θετική δοκιμή οξειδάσης, τα αποτελέσματα των οποίων βοηθούν στη διάκριση των ψευδομονάδων από τα εντερικά βακτήρια [Brock, Biology of Microorganisms, 2005].



ΕΙΚΟΝΑ 2: Τριβλίο Petri με αποικίες *Pseudomonas fluorescens*. [Hagedorn, 2008, Environmental Microbiology]

1.2 Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila*

Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila* (P.e.) απομονώθηκε για πρώτη φορά το 2001 από ένα θηλυκό άτομο *Drosophila melanogaster*. Το βακτήριο αυτό παρουσιάζει όλα τα γενικά χαρακτηριστικά των ψευδομονάδων. Ο μεταβολισμός της *P. entomophila* στηρίζεται στο μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης, στο μονοπάτι Entner-Doudoroff, στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων, καθώς και σε ένα μη ολοκληρωμένο (λόγω της απουσίας της 6-φωσφοφρουκτοκινάσης) Embden-Meyerhof-Parnas μονοπάτι. Το γονιδίωμά της κωδικοποιεί επίσης για λιπάσες, πρωτεάσες και υδρολάσες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση πολυμερών που απαντώνται στο έδαφος [Brock, Biology of Microorganisms, 2005].

Η *Pseudomonas entomophila* είναι μέχρι στιγμής το μοναδικό γνωστό

στέλεχος που εμφανίζει παθογένεια στην *Drosophila melanogaster*, παρόλο που δεν έχει εκκριτικό σύστημα τύπου III [Vodovar et al., 2006; Papagiannoulis et al., 2009]. Συγκεκριμένα, μόλυνση από *P. entomophila* μετά από κατάποσή της επάγει θνησιμότητα στις προνύμφες μέσα στις πρώτες 24 ώρες σε ποσοστό πάνω από 70%, ενώ το υπόλοιπο 30% πεθαίνει στο στάδιο της νύμφης [Vodovar et al., 2005].

Η *P. entomophila* μπορεί επίσης να σκοτώσει και μέλη από άλλα είδη εντόμων, όπως *Bombyx mori*, *Anopheles gambiae*, πράγμα που την καθιστά ένα νέο εντομοπαθογόνο βακτήριο [Isabelle Vallet-Gely et al., 2009]. Αλλά η ικανότητα της να μολύνει δια στόματος την *Drosophila melanogaster* και να προκαλεί τον θάνατο τόσο στα ενήλικα άτομα, όσο και στις προνύμφες [Vodovar et al., 2005] έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα, αφού αποτελεί ένα κατάλληλο μοντέλο για την μελέτη αλληλεπιδράσεων παθογόνου-ξενιστή [Liehl et al. 2006, Vodovar et al., 2006, Vodovar et al., 2005] και όλα δείχνουν ότι το νεοανακαλυφθέν αυτό βακτήριο θα αποτελέσει στο μέλλον αντικείμενο εντατικής μελέτης.

1.3 Δομή του γονιδιώματος του βακτηρίου *P. entomophila*

Η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματος της *P. entomophila* ολοκληρώθηκε το 2006 (Vodovar N. et al., 2006) και αποκαλύφθηκε πως αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα 5.888.780 ζευγών βάσεων. Ανάμεσα στις 5.169 κωδικοποιούσες αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν, έχουν αποδοθεί συγκεκριμένες λειτουργίες σε ένα ποσοστό 67%, δηλαδή σε περίπου 3.466 γονίδια.

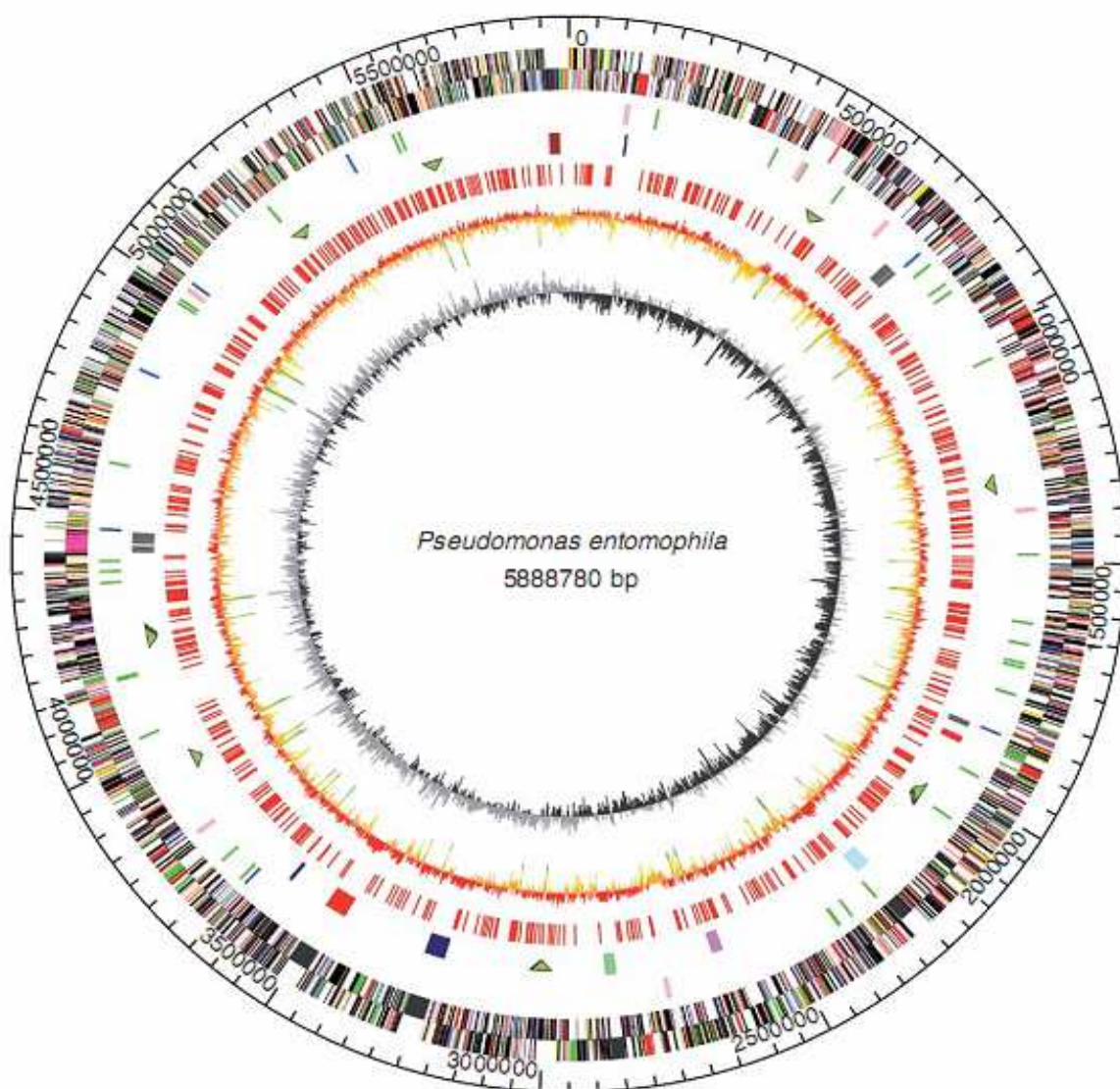
General features	<i>Pe</i>	<i>Pp</i> ^a	<i>Pf</i> ^a	<i>Pa</i> ^a	<i>Pst</i> ^a
Size (Mb)	5.9	6.2	7.1	6.3	6.4
GC (%)	64.2	61.6	63.3	66.6	58.4
Nb CDS	5169	5420	6144	5570	5615
Coding (%)	89.1	87.7	88.8	89	86.8
rRNA operon	7	7	5	4	5
tRNA	78	74	71	63	63
Protein with predicted function (%)	67.1	65.8	62.2	54.2	61.0
Proteins without predicted function					
Conserved hypothetical proteins (%)	25.3	19.1	32.5	13.8	17.0
Hypothetical proteins (%)	7.5	15.1	5.3	31.9	22.0

EIKONA 3: Χαρακτηριστικά του γονιδιώματος διαφόρων ειδών του γένους *Pseudomonas*. Παρατηρούμε ότι το μέγεθος του γονιδιώματος του *P.e.* είναι μικρότερο σε σύγκριση με τα

άλλα είδη που φαίνονται στην εικόνα, πιθανότατα λόγω του περιορισμένου αριθμού μεταθετών στοιχείων (transposons) και βακτηριοφάγων στο γονιδίωμα [Vodovar et al. 2006].

Η σύγκριση των γονιδιωμάτων των 5 αντιπροσωπευτικών ειδών *Pseudomonas* με το πρόγραμμα BLAST, αποκάλυψε πως το κυρίως γονιδίωμα του γένους αποτελείται από 2.065 γονίδια. Με βάση αυτή την ανάλυση ταυτοποιήθηκαν 1.002 γονίδια μοναδικά στο γονιδίωμα της *P. entomophila* [Vodovar N. et al., 2006].

Επιπλέον, η σύγκριση των γονιδιωμάτων κατέδειξε πως η *P. entomophila* έχει τουλάχιστον 3.630 (70,2%) γονίδια που έχουν ορθόλογά τους στην *P. putida*, πράγμα που επιβεβαιώνει τη στενή συγγενική τους σχέση. Αντίθετα με την *P. putida* όμως, το γένωμα της *P. entomophila* περιέχει πολλά γονίδια σημαντικά για την παθογένεια διαφόρων εντόμων. Η *P. entomophila* μπορεί να εκκρίνει πολλά αποδιατακτικά ένζυμα (πρωτεάσες και λιπάσες), τοξίνες και δευτερογενείς μεταβολίτες (π.χ. HCN) [Vodovar et al. 2006].



ΕΙΚΟΝΑ 4: Κυκλική αναπαράσταση του γονιδιώματος του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila*. [Vodovar N. et al., 2006]

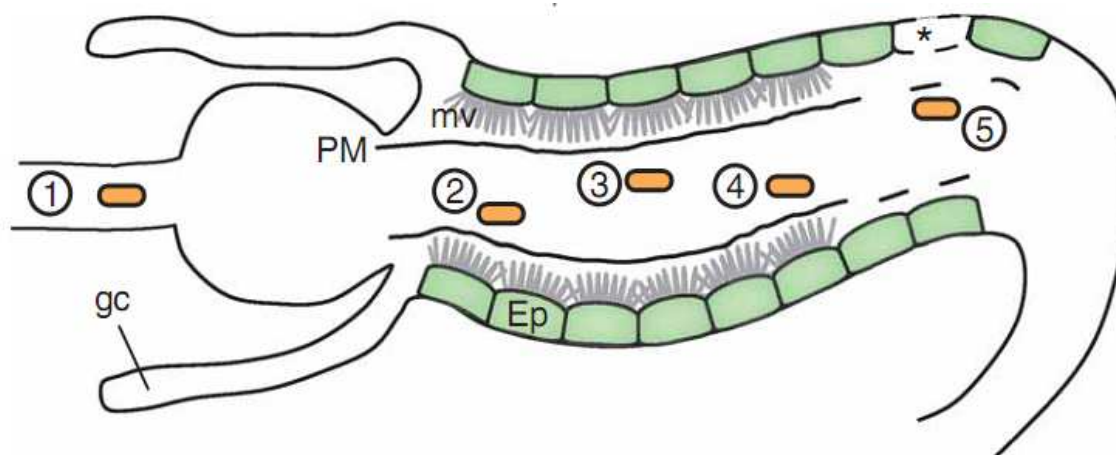
1.4 Παθογένεια του βακτηρίου

Η μολυσματικότητα της *P. entomophila* είναι πολυπαραγοντική, ενώ διαφορετικοί παράγοντες επάγουν την ανοσοαπόκριση του ξενιστή και διαφορετικοί προωθούν την παθογένεια. Ανάλυση του γονιδιώματος έχει δείξει πως η *P. entomophila* παράγει τοξίνες, πρωτεΐνες μολυσματικότητας, καθώς και δευτερογενείς μεταβολίτες που συμμετέχουν στη διαδικασία καταστροφής των ιστών του ξενιστή. Διαφορετικοί τοξικοί παράγοντες είναι δυνατόν να δράσουν συνδυαστικά στην παθογένεια, ενώ σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι πως δίνουν τη δυνατότητα στον παθογόνο μικροοργανισμό να επιβιώσει μέσα στο περιβάλλον του ξενιστή. Έτσι η *P. entomophila* έχει την ικανότητα, λόγω των παραγόντων μολυσματικότητας που εκφράζει να «διαφεύγει» από την ανοσοαπόκριση του ξενιστή.

Το εντομοπαθογενικό βακτήριο *P. entomophila* μπορεί να μολύνει διάφορα έντομα, ωστόσο η μόλυνση της *Drosophila melanogaster* από την ψευδομονάδα αποτελεί το καταλληλότερο μοντέλο μελέτης της παθογένειας του βακτηρίου.

Η μόλυνση της *Drosophila* από την *P. entomophila* χωρίζεται σε 5 διακριτά στάδια:

- Δια στόματος πρόσληψη της *P. entomophila* από την *Drosophila* και κατάποσή της από τον οισοφάγο
- Ενεργοποίηση στο έντομο των γονιδίων που του προσδίδουν ανθεκτικότητα σε καταστάσεις οξειδωτικού stress λόγω της εισβολής του παθογόνου, όπως πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, αναστολείς πρωτεασών σερίνης, πρωτεΐνες απάντησης σε stress, καθώς και γονίδια που συμμετέχουν στο JAK/STAT και στο JNK μονοπάτι.
- Παραμονή της *P. entomophila* στο έντερο του ξενιστή
- Ενεργοποίηση της πρωτογενούς ανοσοαπόκρισης του ξενιστή με την έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων για την αντιμετώπιση της εισβολής. Το βακτήριο εκκρίνει την μεταλλοπρωτεάση AprA ώστε να διαφύγει από την ανοσοαπόκριση.
- Παθογένεια και θάνατος λόγω σημαντικών τροποποιήσεων της φυσιολογίας του μεσεντέρου, όπως καταστροφή των μικρολαχνών και των κυττάρων και αποδιοργάνωση της περιτροφικής μήτρας. [Vodovar et al., 2006]



ΕΙΚΟΝΑ 5: Στάδια μόλυνσης της *D. melanogaster* από την *P. entomophila* [Vodovar et al., 2006]

Με χρήση της RT-qPCR έγινε ανάλυση του συνολικού mRNA της *Drosophila* που παρήχθηκε μετά από φυσική μόλυνση με *P. entomophila*. Η ανάλυση έδειξε την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs), όπως η Διπερισίνη και η Δροσομυσίνη στο έντερο των ενήλικων ατόμων και των προνυμφών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε έκφραση των AMPs στην τραχεία, καθώς και στο πρόσθιο τμήμα του μεσεντέριου, ενώ μέσω γονιδίων αναφοράς εντοπίστηκαν AMPs και στο λιπαρό σώμα των προνυμφών (Vodovar N. et al., 2005). Η *P. entomophila* είναι ικανή λοιπόν να προκαλέσει και συστηματική, αλλά και τοπική ανοσοαπόκριση όταν μολύνει την *Drosophila*.

- Στο γονιδίωμα της *P. entomophila* αποκαλύφθηκε η ύπαρξη 3 γονιδίων, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες τοξινών (Vodovar N. et al., 2006). Αυτές είναι τοξίνες τύπου Tcc και είναι οι εξής: PSEEN2485, PSEEN2697, PSEEN2788.
- Οι πρωτεάσες αποτελούν μια άλλη σημαντική ομάδα εκκρινόμενων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην μολυσματικότητα των βακτηρίων. Η *P. entomophila* κωδικοποιεί για 3 πρωτεάσες σερίνης, καθώς και για μια αλκαλική πρωτεάση, την AprA, η οποία έχει βασικό ρόλο στην μολυσματικότητα. Η AprA είναι μια εκκρινόμενη μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου 51kDa, που ρόλος της είναι η αποικοδόμηση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων της *Drosophila* που παράγονται από το επιθήλιο του εντέρου. Με αυτό τον τρόπο προστατεύει την *P. entomophila*, η οποία

διαφεύγει με αυτόν τον τρόπο από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Liehl P. et al, 2006).

- Οι βακτηριακές αιμολυσίνες είναι εξοτοξίνες, που στοχεύουν στις μεμβράνες των κυττάρων του αίματος και προκαλούν ρήξεις στα κύτταρα, με ένα μηχανισμό που δεν είναι ακόμα απόλυτα κατανοητός. Η *P. entomophila* παρουσιάζει έντονη αιμολυτική δραστηριότητα η οποία ελέγχεται από το σύστημα Gac (όπως και το HCN). Ο αιμολυτικός παράγοντας της *P.e.* αναγνωρίστηκε ως ένα κυκλικό λιποπεπτίδιο (CLP) [Isabelle Vallet-Gely et.al, 2009].

Τα CLPs είναι ανθεκτικά μόρια με αντιμικροβιακές και κυτταροτοξικές ιδιότητες τα οποία παράγονται με έναν μηχανισμό ανεξάρτητου του ριβοσώματος ο οποίος χρησιμοποιεί πολυλειτουργικά ένζυμα που καλούνται μη-ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPs) [Marahiel et al, 1997, Stachelhaus et. al. 1999].

Στο γονιδίωμα της *Pseudomonas entomophila* αρκετά γονίδια βρέθηκαν ότι κωδικοποιούν για την παραγωγή λιποπεπτιδίων, ενώ 3 γονίδια κωδικοποιούν για παραγωγή NRPs. Μελετήθηκε ο φυσιολογικός ρόλος των λιποπεπτιδίων και βρέθηκε ότι δεν παίζουν ρόλο στην παθογένεια του βακτηρίου εναντίον της *Drosophila*. [Isabelle Vallet-Gely et.al, 2009].

1.5 Υδροκυάνιο (HCN)

Το HCN είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης, ο οποίος μέχρι σήμερα δε φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στον πρωτογενή μεταβολισμό των βακτηρίων. Η δράση του εντοπίζεται στην αναπνευστική αλυσίδα, όπου λειτουργεί σαν αναστολέας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Είναι πτητική χημική ένωση με τοξική δράση και όλα τα βακτηριακά στελέχη που το παράγουν το εκκρίνουν στο περιβάλλον τους.

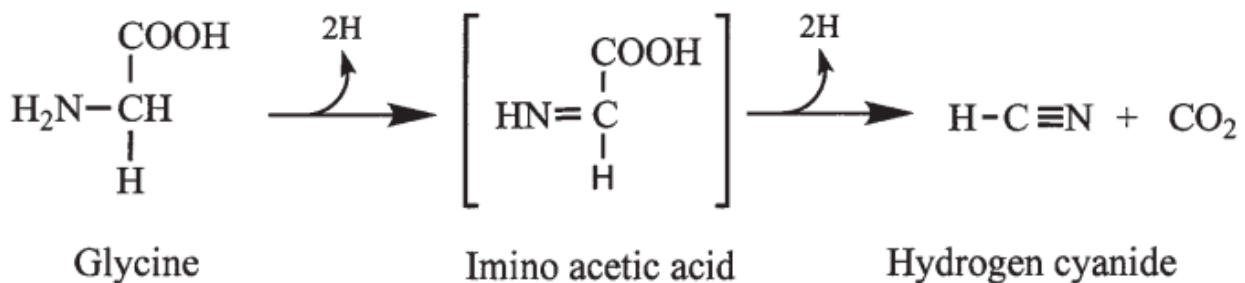
Η παραγωγή υδροκυανίου σε βακτήρια του γένους *Pseudomonas* μελετήθηκε το 1983, όταν εντοπίστηκαν σε δείγματα νερού 5 στελέχη *P. fluorescens* και ένα στέλεχος *P. aeruginosa* που μπορούσαν να παράγουν HCN. Ο μέγιστος βαθμός κυανογένεσης παρατηρήθηκε σε θερμοκρασίες 25-30°C και σε pH 6,6-8,9.

Το υδροκυάνιο παράγεται στο μέγιστο βαθμό κατά τη μετάβαση από την εκθετική φάση ανάπτυξης στην στατική και για την παραγωγή του απαιτείται οξυγόνο σε μικρή συγκέντρωση (μικροαεροφιλικές συνθήκες ~5%) [Lavill et. al,

1998].

Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση παραγωγής του HCN είναι η συνθάση του HCN. Είναι ένα μεμβρανικό φλαβοένζυμο, το οποίο χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα την γλυκίνη και μέσω οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης την μετατρέπει σε HCN και CO₂ (ΕΙΚ.5) [Castric P.A., 1977]. Η συνθάση του HCN είναι πολύ ασταθής και ευαίσθητη στο οξυγόνο και γι'αυτό το λόγο έχει καθαριστεί μόνο μερικώς [Blumer and Haas, 2000].

HCN synthase (HcnABC)

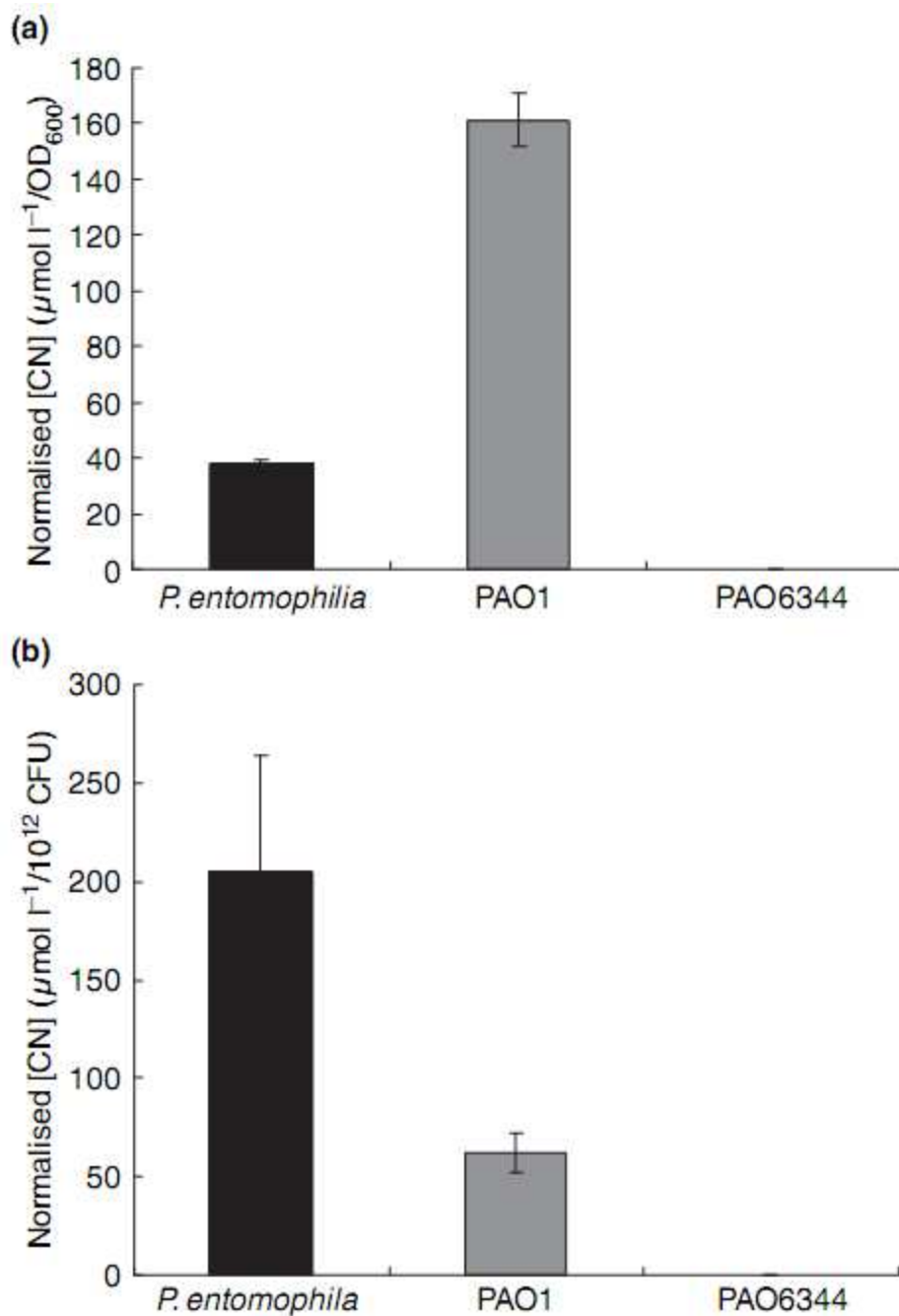


ΕΙΚΟΝΑ 6: Η μετατροπή της γλυκίνης σε υδροκυάνιο, με την καταλυτική επίδραση της συνθάσης του HCN.[Laville et al.1998]

Η συνθάση του HCN κωδικοποιείται από ένα οπερόνιο 3 γονιδίων, τα hcnABC γονίδια (PSEEN5522, PSEEN5521, PSEEN5520). Αυτά τα γονίδια βρέθηκαν και στο γονιδίωμα της *Pseudomonas entomophila* και συμπεράθηκε ότι το βακτήριο είναι κυανογενετικό.

Από μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε πως η *P. entomophila* παράγει υδροκυάνιο σε υγρές καλλιέργειες στην αρχή της στατικής φάσης σε συγκέντρωση έως και 40 μmol L⁻¹, που είναι 3 με 4 φορές χαμηλότερη από την συγκέντρωση που παράγει ο άγριος τύπος *P. aeruginosa*. Παραγωγή HCN παρατηρήθηκε επίσης και σε στερεές καλλιέργειες σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση (>200 μmol L⁻¹) απ' ότι στις υγρές, που είναι 3 φορές υψηλότερη από την συγκέντρωση που παράγει η *P. aeruginosa* στις στερεές (ΕΙΚ. 6) [Ryall et al.,

2009].



ΕΙΚΟΝΑ 7: α) Παραγωγή HCN σε υγρές καλλιέργειες *P. entomophila*

b) Παραγωγή HCN σε στερεές καλλιέργειες *P. entomophila*. Στις στερεές καλλιέργειες παρατηρείται παραγωγή υδροκυανίου σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση.

PAO1: Άγριος τύπος *P. aeruginosa*, PAO6344: μετάλλαγμα ΔhcnB της *P. aeruginosa* [Ryall et al., 2009]

Η παραγωγή του HCN αλλά και ο έλεγχος της παθογένειας στα βακτήρια *Pseudomonas entomophila* γίνεται κυρίως μέσω του συστήματος GacS/GacA, ένα ρυθμιστικό σύστημα δύο στοιχείων [Vodovar et. al. 2006, Vodovar et. al. 2005], που είναι γνωστό ότι ελέγχει την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, την έκκριση πρωτεϊνών και τις παθογενετικές ιδιότητες των γ-πρωτεοβακτηρίων [Larouge et. al. 2008, Yang et.al.2008].

Τα ρυθμιστικά συστήματα δύο στοιχείων είναι ευρέως διαδεδομένα στα Gram (-) βακτήρια. Αυτά τα ρυθμιστικά συστήματα βοηθούν τους μικροοργανισμούς να ανταπεξέλθουν σε ποικίλλες περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και να εγκατασταθούν στις οικοθέσεις τους σε απόκριση ερεθισμάτων από το περιβάλλον τους. Το GacS είναι μια κινάση που ανιχνεύει τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και το GacA είναι ο ρυθμιστής απόκρισης στο ερέθισμα.

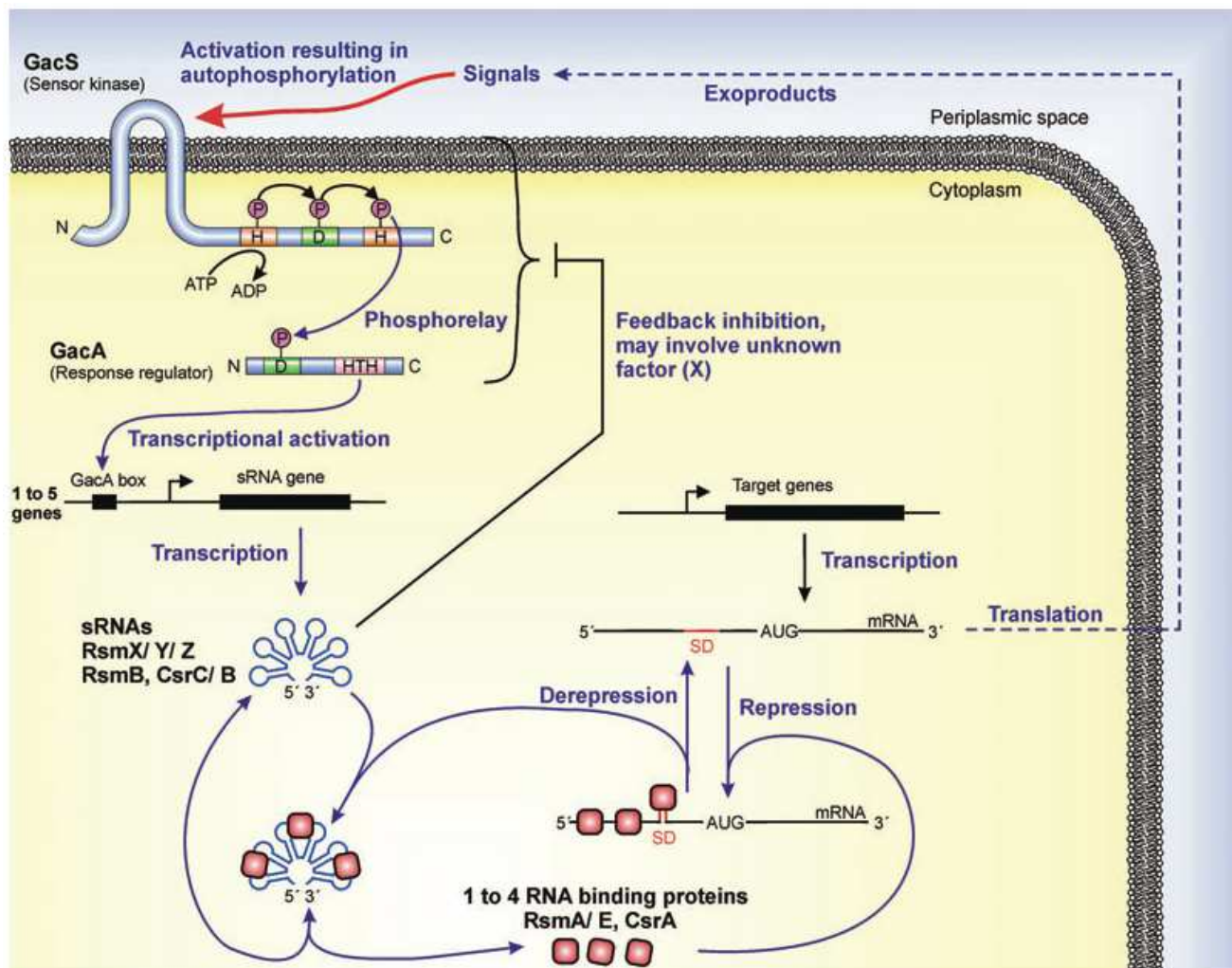
Στην *P. entomophila* η έκκριση των σηματοδοτικών μορίων που ενεργοποιούν το GacS/GacA σύστημα παρατηρείται όταν ο βακτηριακός πληθυσμός βρίσκεται σε μεγάλη πυκνότητα και στο χρονικό σημείο κατά το οποίο γίνεται η μετάβαση από την εκθετική φάση ανάπτυξης στην στατική φάση [Blumer et al. 1999]. Ο πολύ σημαντικός ρόλος που επιτελεί το σύστημα στην παθογένεια του βακτηρίου καταδεικνύεται από το γεγονός πως μεταλλαγμένα στελέχη gacS/gacA της *P. entomophila* εμφανίζουν μειωμένη ή καθόλου παθογένεια στη *Drosophila*, ενώ δεν παρατηρείται καμιά παραγωγή υδροκυανίου [Vodovar et al., 2005].

Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου συστήματος γίνεται ως εξής:

- Η επίδραση ενός ερεθίσματος οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση του GacS σε μια εξελικτικά συντηρημένη ιστιδίνη.
- Στη συνέχεια το GacS ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης το GacA.
- Το GacA επάγει την έκφραση των γονιδίων rsmX, rsmY, rsmZ, τα οποία μεταγράφονται στα 3 αντίστοιχα μικρά ρυθμιστικά RNAs (sRNAs). Ρόλος των τριών αυτών sRNAs είναι να δεσμεύουν τις πρωτεΐνες RsmA και RsmE, με αποτέλεσμα να επιτρέπουν την αντιγραφή των γονιδίων του δευτερογενούς μεταβολισμού. Το GacA ενεργοποιεί ή καταστέλλει έτσι την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων.
- Τα γονίδια που η έκφρασή τους ρυθμίζεται από το σύστημα σε μεταγραφικό επίπεδο, ρυθμίζονται παράλληλα και από τις πρωτεΐνες RsmA και RsmE.

Τα ερεθίσματα που ενεργοποιούν ρυθμιστικά συστήματα 2 στοιχείων σχετίζονται με το περιβάλλον (pH, θερμοκρασία, οσμωμοριακότητα) ή με οργανισμούς: μερικά από τα ερεθίσματα παράγονται από τους ξενιστές των βακτηρίων, ενώ άλλα συντίθενται από τα ίδια τα βακτήρια. Όταν το σύστημα

GacS/GacA δεν είναι ενεργοποιημένο, τότε οι πρωτεΐνες RsmA και RsmE δρουν σαν καταστολείς των γονιδίων που κωδικοποιούν για δευτερογενείς μεταβολίτες. Υπερέκφραση της RsmA επίσης καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που



ρυθμίζονται από το GacS/GacA σύστημα [Blumer et al. 1999].

ΕΙΚΟΝΑ 8: Σχηματική αναπράσταση των γενικών χαρακτηριστικών του GacS/GacA σηματοδοτικού μονοπατιού στην *P. entomophila* [Lapouge et. al. 2008].

1.6 Μηχανισμοί αυτοπροστασίας των κυανογενετικών βακτηρίων από το τοξικό HCN

Τα βακτηριακά στελέχη που παράγουν υδροκυάνιο και το εκκρίνουν στο περιβάλλον τους διαθέτουν επιπλέον και μηχανισμούς που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα και τους προστατεύουν από την τοξική δράση του HCN. Βασικό μηχανισμό αυτοπροστασίας αποτελεί η μη-ευαίσθητη στο κυάνιο οξειδάση (CIO).

Η έκφραση και παραγωγή αυτής της οξειδάσης επιτρέπει στα βακτήρια να αναπτύσσονται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων υδροκυανίου (Zlosnik et al., 2006; Cooper et al., 2003). Σημαντικό ρόλο στην αυτοπροστασία των βακτηρίων επιτελεί και το ένζυμο ροδανάση (Rhodanese). Η ροδανάση έχει τη δυνατότητα να αποτοξικοποιεί το υδροκυάνιο, μετατρέποντάς το σε θειοκυάνιο.

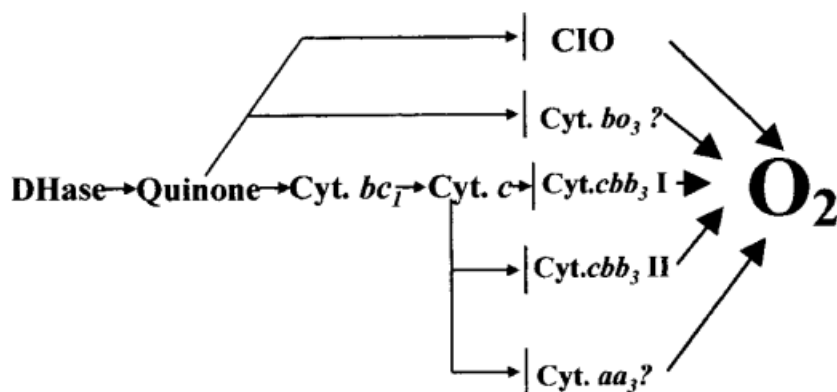
1.6.1. CIO

Στο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* παράγεται κατά την στατική φάση ανάπτυξης μία μη-ευαίσθητη στο κυάνιο οξειδάση (Cyanide Insensitive Oxidase, CIO), η οποία επιτρέπει την αερόβια αναπνοή ακόμα και στην παρουσία υψηλής συγκέντρωσης κυανίου (>1 mM) [Rita Cipollone et al. 2007, Zlosnik et. al. 2006, Cooper et. al. 2003]. Οξειδάσες ευαίσθητες στο HCN αναστέλλονται σε συγκεντρώσεις της τάξης των 100 μ M ή και μικρότερες [Poole & Cook, 2000].

Ανάλυση του γονιδιώματος του βακτηρίου *P. aeruginosa* καταδεικνύει την ικανότητα σχηματισμού μιας πολύπλοκης αναπνευστικής αλυσίδας η οποία αποτελείται από 5 τελικές οξειδάσες [Stover et al., 2000; Cooper et al. 2003]. Τέσσερις από τις τελικές οξειδάσες ανήκουν στην υπεροικογένεια οξειδασών αίμης-χαλκού. Δύο από αυτές είναι οξειδάσες του κυτοχρώματος τύπου cbb3 [Comolli & Donohue, 2002], μία του κυτοχρώματος τύπου aa3, το οποίο είναι συνηθισμένο σε πολλά βακτηριακά είδη και σχετίζεται στενά με την μιτοχονδριακή οξειδάση του κυτοχρώματος c [Fujiwara et al., 1992] και μία είναι οξειδάση υδροκινόνης που σχετίζεται με το κυτόχρωμα bo3 του βακτηρίου *E.coli*. Η πέμπτη είναι η CIO και είναι ομόλογη με τις οξειδάσες υδροκινόνης του κυτοχρώματος bd, που είναι ο μόνος τύπος βακτηριακών οξειδασών που δεν είναι μέλη της οικογένειας αίμης-χαλκού (EIK. 8) [Cunningham et al., 1997; Junemann, 1997; Poole & Cook, 2000].

Υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης O_2 , το βακτήριο *P. aeruginosa* συνθέτει HCN ως μεταβολικό προϊόν, σε συγκεντρώσεις μέχρι 300 μ M. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις το HCN αναστέλλει την λειτουργία των οξειδασών κυτοχρώματος της υπεροικογένειας αίμης-χαλκού [Cooper et al., 2003]. Με την ανάπτυξη της αναπνευστικής αλυσίδας που περιλαμβάνει την CIO όμως, η *P. aeruginosa* κατορθώνει να επιτελεί την αερόβια αναπνοή του ακόμα και στην παρουσία αυτού του πολύ ισχυρού αναστολέα οξειδασών.

Γι' αυτό, η CIO έχει προταθεί ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο να επιτρέπει την αερόβια αναπνοή σε συνθήκες κυανογένεσης και να προστατεύει κατ' επέκταση τα κυανογενετικά βακτήρια από την τοξική δράση του κυανίου.



ΕΙΚΟΝΑ 9: Οι 5 τελικές οξειδάσες στην αναπνευστική αλυσίδα του βακτηρίου *P.aeruginosa*. [M. Cooper, et.al. 2003].

1.6.2. ΡΟΔΑΝΑΣΗ (RHODANESE)

Οι ροδανάσες (EC 2.8.1.1.), είναι θειοτρανσφεράσες θειοθειικού ανιόντος ($S_2O_3^{2-}$) και κυανίου. Καταλύουν την μεταφορά ενός ατόμου θείου από κατάλληλο δότη (π.χ. θειοθειικό ανιόν, thiosulfate) στο κυάνιο, παράγοντας με αυτό τον τρόπο το λιγότερο τοξικό θειοκυάνιο [Cipollone et al., 2007, Westley et al. 1983].

Οι ροδανάσες έχουν απομονωθεί από πληθώρα οργανισμών. Οι λειτουργίες του ενζύμου δεν είναι ακόμα απόλυτα ξεκαθαρισμένες, ωστόσο αυτά τα ένζυμα φαίνεται να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση του κυανίου στα ζώα [Aminlari, M., and M. Shahbazi. 1994, Aminlari et al. 2002, Sylvester, M., and C. Sander. 1990] και σε κυανογενετικά βακτήρια. Έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη αυτών των ενζύμων σε πολλά βακτηριακά είδη, όπως στο *E.coli* [Ray et al. 2000], στο *Azotobacter vinelandii* [Bordo et al., 2000] και *Pseudomonas aeruginosa* [Cipollone et al. 2004].

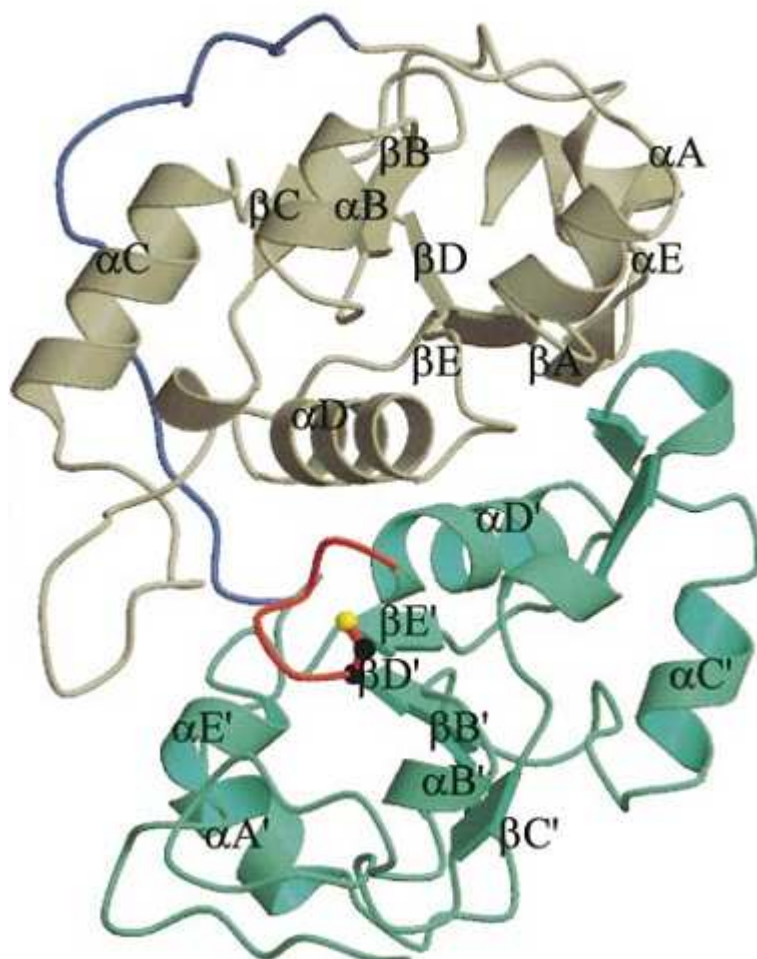
ΔΟΜΗ:

Η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης είναι γνωστή και ενδελεχώς μελετημένη στο βακτήριο *Azotobacter vinelandii*. Αποτελείται από 2 πανομοιότυπες αναδιπλωμένες δομικές περιοχές, τις RHOD δομικές περιοχές, μήκους 125 αμινοξέων η καθεμία. Οι 2 RHOD περιοχές παρουσιάζουν αρκετή ομοιότητα στην τρισδιάστατη απεικόνισή τους, ενώ 26 από τα συνολικά 125 αμινοξέα στην καθεμία είναι ίδια (20,8% ταύτιση αμινοξικής ακολουθίας) [Bordo et al. 2000].

- Η C-τελική περιοχή της ροδανάσης είναι η καταλυτική περιοχή (catalytic domain), η οποία φιλοξενεί το καταλυτικό αμινοξύ κυστεΐνη, Cys230, που είναι το πρώτο αμινοξύ από τα 6 που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο του

ενζύμου.

- Η N-τελική περιοχή είναι μη-καταλυτική και στην αντίστοιχη θέση που η C-τελική περιοχή έχει κυστεΐνη υπάρχει ανταυτού το αμινοξύ ασπαρτικό οξύ, Asp. [Bordo & Bork, 2002]
- Οι 2 περιοχές συνδέονται μεταξύ τους με ένα πεπτίδιο – συνδέτη μήκους 17 αμινοξέων το οποίο τυλίγεται γύρω από την N-τελική περιοχή και καταλήγει στην αρχή της C-τελικής περιοχής.
- Το ενεργό κέντρο αποτελείται από μια αλληλουχία 6 αμινοξέων, το πρώτο εκ των οποίων είναι η Cys230, που σχηματίζουν θηλιά (loop). Περιβάλεται από ένα ισχυρό θετικό ηλεκτροστατικό πεδίο, που πηγάζει από την δομή της θηλιάς του κέντρου και από θετικά φορτισμένα μόρια που γειτνιάζουν με αυτό. Έτσι, η ενζυμική δραστηριότητα ουσιαστικά εξαρτάται από την δομή της θηλιάς και από την επίδραση που έχει το ηλεκτροστατικό πεδίο στην pKa της καταλυτικής Cys230 [Bordo et al. 2000].



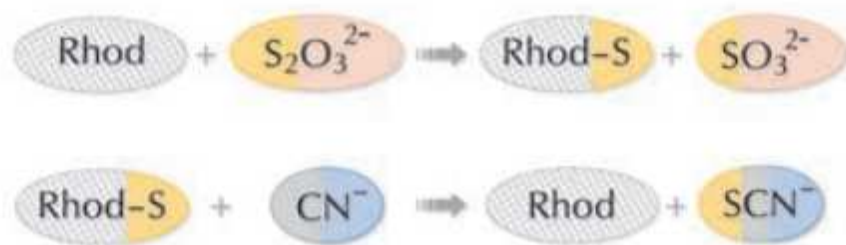
ΕΙΚΟΝΑ 10: Η δομή του ενζύμου της ροδανάσης του βακτηρίου *Azotobacter vinelandii*. Διακρίνονται οι N- και C- δομικές περιοχές (γκρι και γαλάζιο αντίστοιχα), το πεπτίδιο-συνδέτης (μπλε) και το ενεργό κέντρο του ενζύμου (κόκκινο). Η κυστεΐνη Cys230

αναπαρίσταται σε μοντέλο σφαίρας-γραμμής (ball and stick) στο άκρο του ενεργού κέντρου [Bordo et. al. 2000].

ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Σύμφωνα με τον αποδεκτό μηχανισμό δράσης, το ένζυμο ανακυκλώνεται κατά την διάρκεια της κατάλυσης ανάμεσα σε 2 διακριτές μορφές: το ελεύθερο ένζυμο (Rhod) και το ισοσθενές ενδιάμεσο θειο-ένζυμο (Rhod-S) [Bordo et al., 2000].

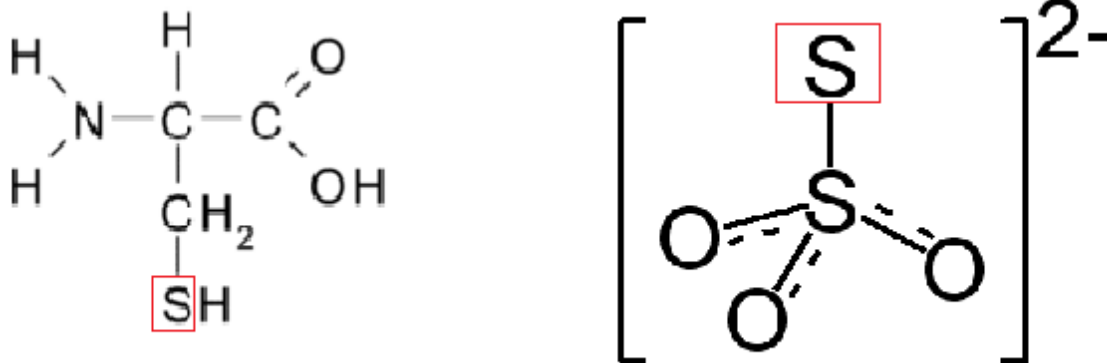
Ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα.



ΕΙΚΟΝΑ 11: Σχηματική αναπαράσταση της χημικής αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο ροδανάση. [Bordo & Bork, 2002]

Το ισχυρά θετικά φορτισμένο ενεργό κέντρο του ενζύμου έλκει το θειοθειϊκό ανιόν ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) και επιπλέον η στερεοδιάταξη των 6 αμινοξέων του κέντρου επιτρέπει το ιδανικό ταίριασμα με το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Η πλευρική ομάδα της Cys230 περιλαμβάνει ένα άτομο S, το οποίο και σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με ένα άτομο S από τον δότη $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. Δημιουργείται έτσι η ενδιάμεση μορφή Rhod-S. Αυτή είναι η δραστική μορφή του ενζύμου. Παρουσία κατάλληλου δέκτη, όπως το CN^- , διασπάται ο δισουλφιδικός δεσμός και το άτομο θείου (που προήλθε από το θειοθειϊκό ανιόν) μεταφέρεται στο πυρηνόφιλο κυάνιο, σχηματίζοντας έτσι SCN, μια πολύ λιγότερο τοξική κυανιούχα ένωση.

Αυτή η απομάκρυνση του ατόμου S έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση της στερεοδιάταξης του ενεργού κέντρου και την μερική απώλεια της δραστικότητας του ενζύμου. Κατ' επέκταση, παρουσία του κατάλληλου δότη, το ένζυμο υφίσταται ένα κύκλο κατάλυσης ο οποίος αποκαθιστά την δραστική Rhod-S μορφή του ενζύμου. [Bordo et al., 2000]



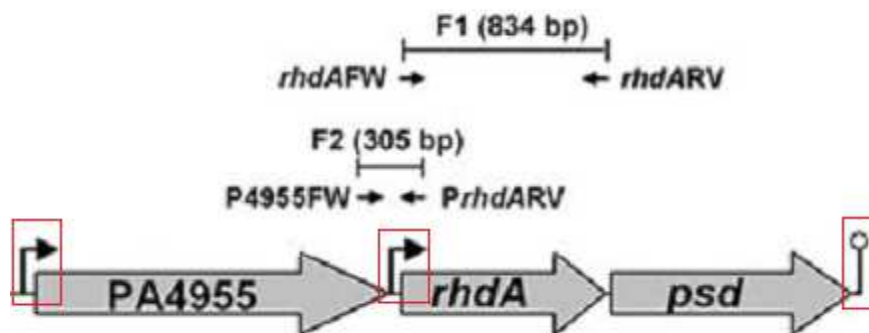
ΕΙΚΟΝΑ 12: Σχηματική αναπαράσταση της κυστεΐνης (αριστερά) και του θειοθειικού ανιόντος (δεξιά). Σε κόκκινο πλαίσιο διακρίνονται τα 2 άτομα θείου που σχηματίζουν τον δισουλφιδικό δεσμό.

Ο ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΣ ΤΟΠΟΣ ΤΗΣ ΡΟΔΑΝΑΣΗΣ

Μετά από μελέτη του γονιδιώματος του άγριου τύπου του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν 10 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs) που κωδικοποιούν για 10 γονιδιακά προϊόντα, τα οποία διαθέτουν τουλάχιστον μία RHOD δομική περιοχή και επομένως είναι υποψήφια να είναι η ροδανάση. Ένα από αυτά, το PA4956 (σημειώνεται ως RhdA) εμφανίζει το τυπικό μοτίβο μιας θειοτρανσφεράσης θειοθειικού ανιόντος/κυανίου και επιπλέον το τρισδιάστατο μοντέλο του γονιδιακού προϊόντος RhdA παρουσιάζει εντυπωσιακή ομοιότητα με τις κρυσταλλικές δομές της ροδανάσης του βακτηρίου *A. vinelandii* και του βοδιού. Το RhdA είναι η κύρια κυτταροπλασματική ροδανάση στον άγριο τύπο *P. aeruginosa* [Cipollone et.al. 2007]

Η ανάλυση του γονιδιακού τόπου του RhdA και μελέτη του τρόπου μεταγραφής του καταδεικνύει ότι το *rdhA* γονίδιο σχηματίζει μία μεταγραφική μονάδα με τα πλευρικά γονίδια PA4955 και *psd* (PA4957). Σε μεταγραφικό επίπεδο η έκφραση του γονιδίου της ροδανάσης ελέγχεται από 2 υποκινητές: τον άνω (upstream) υποκινητή ο οποίος βρίσκεται πριν από το PA4955 και τον κάτω (downstream) υποκινητή που βρίσκεται στην ενδιάμεση περιοχή των PA4955-*rdhA*. Η μεταγραφή ελέγχεται ταυτόχρονα και από τους 2 υποκινητές και τα μεταγραφήματα που προκύπτουν συμμετέχουν αθροιστικά στην έκφραση του γονιδίου *rdhA* και στην παραγωγή έτσι της ροδανάσης. [Cipollone et.al. 2007]

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ανάλογη οργάνωση του γονιδιακού τόπου της ροδανάσης διατηρείται σε πολλά είδη rRNA τύπου I ψευδομονάδων. [Cipollone et.al. 2007]



ΕΙΚΟΝΑ 13: Σχηματική αναπράσταση του γονιδιακού τόπου της ροδανάσης στο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*. Τα γκρι βέλη δείχνουν τον προσανατολισμό των κωδικοποιουσών περιοχών (ORFs). Σε κόκκινο πλαίσιο δείχνονται οι 2 υποκινητές της μεταγραφής και ο παράγοντας τερματισμού της μεταγραφής (δεξιά). Το γονίδιο *rhdA* είναι μήκους 834 bp. [Cipollone et.al. 2007]

Σε ρυθμιστικό επίπεδο, η ροδανάση εκφράζεται κατά την διάρκεια ολόκληρου του κυτταρικού κύκλου ανάπτυξης. Παρουσιάζει αύξηση κατά το εκθετικό στάδιο, φτάνοντας στο μέγιστο κατά την έναρξη της φάσης στασιμότητας και από κει και πέρα μειώνεται ελαφριά. Βακτηριακή ανάπτυξη παρουσία εξωγενούς κυανίου μειώνει την έκφραση του *rdhA* γονιδίου, με πιο έντονο αποτέλεσμα στην φάση στασιμότητας. Αυτός ο συγχρονισμός κυανογένεσης/αρνητικής ρύθμισης *RdhA*, αποτρέπει την αέναη αποτοξικοποίηση του κυανίου που θα οδηγούσε στην απώλεια ενός οικολογικά σημαντικού μεταβολίτη (υδροκυάνιο), κρατώντας ταυτόχρονα την συγκέντρωσή του στα επιτρεπτά όρια για την ομαλή ανάπτυξη του βακτηρίου.

ΡΟΔΑΝΑΣΗ: ENZYMO ME ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ

Η ροδανάση του βακτηρίου *P.aeruginosa* εμφανίζει 79% και 22% αμινοξική ομολογία με την ροδανάση του βακτηρίου *Azotobacter vinelandii* και του ευκαρυωτικού οργανισμού *Bos taurus* (γένος βοοειδή) αντίστοιχα [Bordo et al, 2000, Colnaghi, 1996]. Όλα τα αμινοξέα που καθορίζουν την δομή του ενεργού κέντρου της ροδανάσης του βακτηρίου *A.vinelandii* είναι πλήρως διατηρημένα και στο γονιδιακό προϊόν *RdhA* του βακτηρίου *P.aeruginosa*, παρουσιάζοντας 100% ομολογία στην περιοχή που περιβάλλει το καταλυτικό αμινοξύ Cys230 (ΕΙΚ.13) [Cipollone et al. 2004].

RhdA-P.a.	MSVFS DLPLVIEPSDLA PRLGA - - - PELILVDL TSAA R - - - - - YAEGHI PGARF VD	48
RhdA-A.v.	MDDFAS LPLVIEPADLQ ARLSA - - - PELILVDL TSAA R - - - - - YAEGHI PGARF VD	48
Rhobov	MVHQVL YRA LVSTK W LAES VR AGKV GPGLR VLDAS WY SPGT REAR KEYLERHVP GA SFFD	60
RhdA-P.a.	PKRTQW GOP PAPGL L PAKA D LEAL FGELGHR PEATY VVYD DE - GGGWAGRFI WLLD VI G	106
RhdA-A.v.	PKRTQL GOP PAPGL Q PPRE Q LES LFGELGHR PEAVY VVYD DE - GGGWAGRFI WLLD VI G	106
Rhobov	I EECRD KAS PYE VM L P SEAG FADY VGSLGI SND THV VVYD GDDL G SFY AP RVWWM FR VFG	120
RhdA-P.a.	HHHYHY LNGGL PAW ADA Q ALD REV PAPV GGPL PLT LHDEPS ATREYL Q SRLGA ADLA YW	166
RhdA-A.v.	QQRHYH LNGGL TAW AED R PLS REL PAPAG GPV ALS LHDE PTASR OYLL GRLGA ADLA YW	166
Rhobov	HR T VS V LNGG F RNW LKE G HPV T SEPS R PEPA I FKAT L NR S LLKT Y EQV L ENLE S KRF Q LV	180
RhdA-P.a.	DARN P SEYA GT K - - - VLA AK AGH VP GA IN FEW T AGMD PAR ALRI RAD IAE V LE D LGIT P	222
RhdA-A.v.	DARS P QEY R GEK - - - VLA AK GGH IP GA VN FEW T AAMD PS RALRI RTD IAGR LE E LGIT P	222
Rhobov	DSRA Q G R YL GT QPE P DAV GL DS G HIR G SVN MP F MNF LTE D GFEK S PEEL RAM F E AKK V DL	240
RhdA-P.a.	DKEVIT HCQ THHRS G FTY L YAK ALG YPR V KGYA GS WSE WGN - HPDTP V EY - - - - -	271
RhdA-A.v.	DKEIVT HCQ THHRS G LTY L IAK ALG YPR V KGYA GS WGE WGN - HPDTP V EL - - - - -	271
Rhobov	T KPLI A T CRK GV T A CH I ALA AY L CG KPD V AI Y D GS WF E WF H RAPP ET WVS Q GKG G GKA	297

EIKONA 14: Σύγκριση αμινοξικών αλληλουχιών ανάμεσα στις ροδανάσες από τα βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* (RdhA-P.a.) και *Azotobacter vinelandii* (RdhA-A.v.) και της ροδανάσης από το *Bos taurus* (Rhobov). Σε μαύρο πλαίσιο αναπαρίστανται τα ταυτόσημα αμινοξέα στην αμινοξική αλληλουχία του γονιδιακού προϊόντος μεταξύ των ειδών. Τα 6 αμινοξέα που σχηματίζουν την θηλιά του ενεργού κέντρου [Bordo & Bork, 2002] του ενζύμου είναι υπογραμμισμένα. [Cipollone et al. 2004].

Οι ροδανάσες χαρακτηρίζονται από την παρουσία χαρακτηριστικών δομικών περιοχών που περιλαμβάνουν τις λεγόμενες “υπογραφές” ροδανάσης, π.χ. την παρουσία της κυστεΐνης στην C-καταλυτική περιοχή του ενζύμου [Cipollone et.al. 2004]. Η ροδανάση του σηκωτιού του βοδιού αποτελεί το σημείο αναφοράς για την δομή της υποοικογένειας των ροδανασών [Westley et.al. 1983, Ploegman et.al. 1978].

Η 100% αμινοξική ταύτηση του ενεργού κέντρου του ενζύμου ανάμεσα σε 2 διαφορετικά βακτηριακά γένη, υποδεικνύει την υψηλή διατήρηση της ροδανάσης στους οργανισμούς και τις πιθανές ομοιότητες της λειτουργίας του ενζύμου ανάμεσα σε εξελικτικά παρόμοιους μικροοργανισμούς (π.χ. *Pseudomonas entomophila*).

1.6.3. Συμπερασματικά

Η μη-ευαίσθητη στο κυάνιο οξειδάση CIO θεωρείται το πιο αποτελεσματικό σύστημα για την προστασία του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* από την τοξικότητα του κυανίου. Η CIO παράγεται κατά την έναρξη της στατικής φάσης μετά από έκθεση στο εξωγενές κυάνιο, ενώ η έκφραση της δεν εξαρτάται από την παρουσία ενδογενούς κυανίου [Cooper et.al. 2003]. Έτσι, ενώ η CIO παρέχει μια αποδοτική απόκριση στο εξωγενές κυάνιο, το βακτήριο έχει αναπτύξει επιπλέον στρατηγικές για να αντιμετωπίσει την τοξικότητα του κυανίου που το ίδιο παράγει, όπως τον καθαρισμό του ενδογενούς κυανίου με το ένζυμο ροδανάση [Cipollone et.al. 2007].

Το ότι η ροδανάση προστατεύει τα κυανογενετικά βακτήρια από την τοξική δράση του ενδογενούς κυανίου και όχι του κυανίου του περιβάλλοντός τους, φαίνεται από το εξής: Μετάλλαγμα ΔrdhA που δεν εκφράζει για την παραγωγή ροδανάσης, παρουσιάζει χαμηλή βακτηριακή ανάπτυξη υπό κυανογενετικές συνθήκες και αυτό δείχνει την ανικανότητα του μεταλλάγματος να αντιμετωπίσει το ενδογενές κυάνιο. Αντίθετα, όταν σε καλλιέργειες της *P.aeruginosa*. εφαρμόστηκε εξωγενές κυάνιο, παρατηρήθηκαν πολύ μικρές διαφορές στην βιωσιμότητα του ΔrdhA μεταλλάγματος και του άγριου τύπου του βακτηρίου [Cipollone et.al. 2007].

1.7 Σκοπός

Ο βασικός σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα του γονιδίου που κωδικοποιεί για το ένζυμο ροδανάση και η υπερέκφρασή του. Η διαδικασία αυτή έγινε στο γονίδιο PSEEN4960 του άγριου τύπου του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila*.

Ο περεταίρω καθαρισμός και απομόνωση του ενζύμου σε μεγάλη κλίμακα μπορεί να δώσει το έναυσμα για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό και την μελέτη της δράσης του, ώστε να επιβεβαιωθεί τελικά η λειτουργία του ενζύμου ως προστατευτικός μηχανισμός ενάντια στο HCN που παράγει το στέλεχος της *P. entomophila*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βακτηριακά στελέχη και καλλιέργειες μικροοργανισμών

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- *Pseudomonas entomophila* (P.e.): 'Άγριος τύπος.
- *Escherichia coli* DH5α: Εργαστηριακό στέλεχος, χρήση για τον μετασχηματισμό μέσω ηλεκτροδιάτρησης ως βακτήριο-δέκτης για το πλασμίδιο. Γενότυπος:

F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK⁻ mK⁺), λ⁻

- *Escherichia coli* BL21(DE3): Εργαστηριακό στέλεχος, χρήση ως βακτήριο-

δέκτης του πλασμιδίου στον μετασχηματισμό μέσω ηλεκτροδιάτρησης, για το πείραμα της υπερέκφρασης του ενζύμου της ροδανάσης. Γενότυπος:

F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(rB⁻ mB⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

Το θρεπτικό μέσο Luria Bertani (LB) χρησιμοποιήθηκε σε υγρή και στερεή μορφή για τις καλλιέργειες των μικροοργανισμών.

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν από κύτταρα που πάρθηκαν από ήδη υπάρχουσες ανεπτυγμένες καλλιέργειες, από τις οποίες φτιάχθηκαν stock γλυκερόλης που φυλάσσονται στους -80 °C. Οι καλλιέργειες της *Pseudomonas entomophila* αναπτύχθηκαν στους 30 °C και της *Escherichia coli* στους 37 °C.

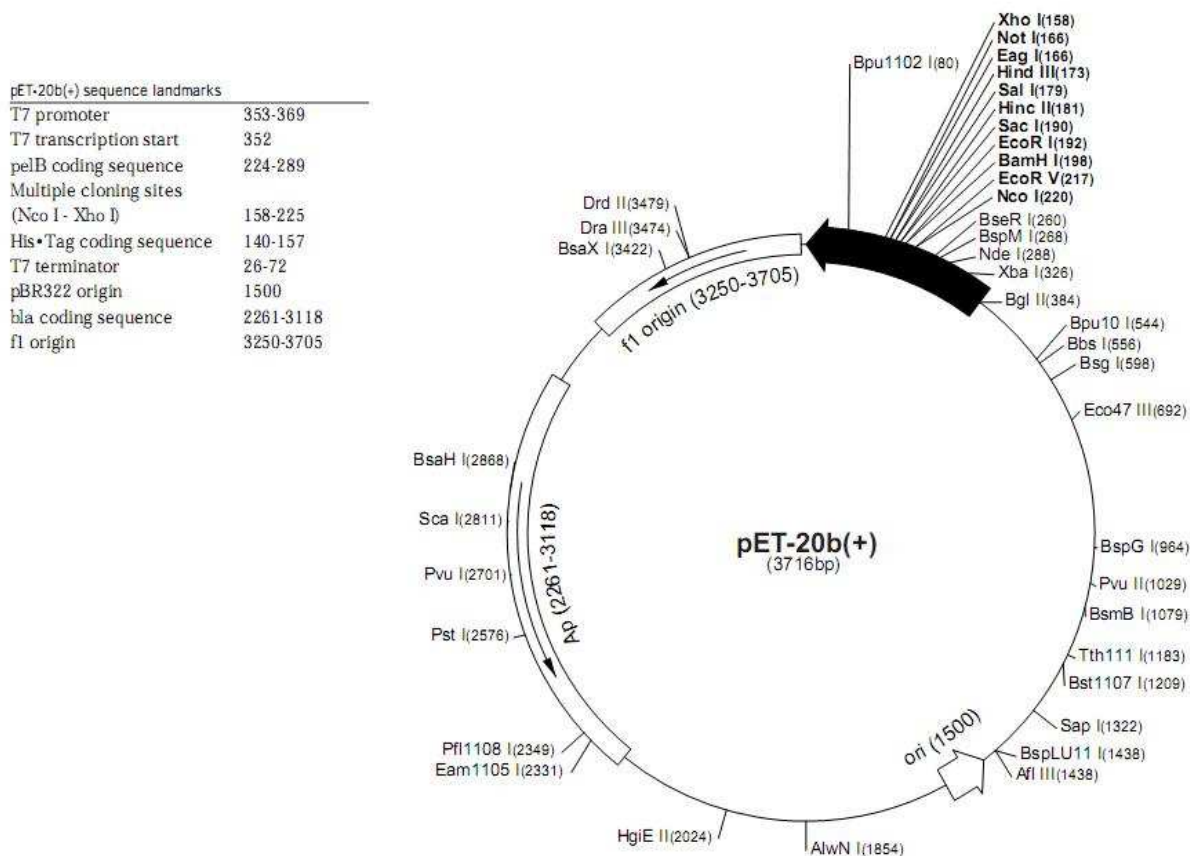
Το αντιβιοτικό που προστέθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα στις περιπτώσεις που η χρήση του ήταν απαραίτητη, είναι η αμπικιλίνη (Ampicillin). Η συγκέντρωση του stock ήταν 100 mg/ml, ενώ η τελική συγκέντρωση 50 µg/ml για τον pET-20b Vector και 100 µg/ml για τον StrataCloneTM Vector (pSC-A).

2.2 Ο πλασμιδιακός φορέας pET-20b(+) vector (Novagen)

- Πλασμιδιακός φορέας μεγέθους 3716bp. Διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.
- Χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων μέσω της T7 RNA πολυμεράσης η οποία διαθέτει τον κατάλληλο επαγωγέα.
- Μετά τον επαγωγέα της T7 RNA πολυμεράσης υπάρχει ο πολυσυνδέτης (polylinker), όπου βρίσκονται όλες οι θέσεις αναγνώρισης και κοπής των διαφόρων ενζύμων περιορισμού. Με την χρήση λοιπόν των κατάλληλων ενζύμων γίνεται η εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου (της ροδανάσης στην παρούσα εργασία) στο εσωτερικό του πολυσυνδέτη και στην συνέχεια, η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου αυτού μετά απο πρόσδεση της T7 RNA πολυμεράσης στον επαγωγέα της.
- Φέρει μια σηματοδοτική αλληλουχία στο N-τελικό του άκρο για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στο περιπλάσμα, η οποία αποκόπτεται όμως κατά την κοπή του με τα περιοριστικά ένζυμα BamH I και Hind III.
- Φέρει μια αλληλουχία 6His στο C-τελικό άκρο για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης και απομόνωσή της με χρωματογραφία νικελίου η οποία δεσμεύει τις ιστιδίνες και συγκρατεί την πρωτεΐνη πάνω της.
- Η μεταγραφή σταματά από ένα κωδικόνιο λήξης αμέσως μετά τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν τις 6 ιστιδίνες.
- Δεν διαθέτει το το οπερόνιο της λακτόζης (lacZ), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επιλογή των αποκίων που έχουν προσλάβει το επιθυμητό πλασμίδιο

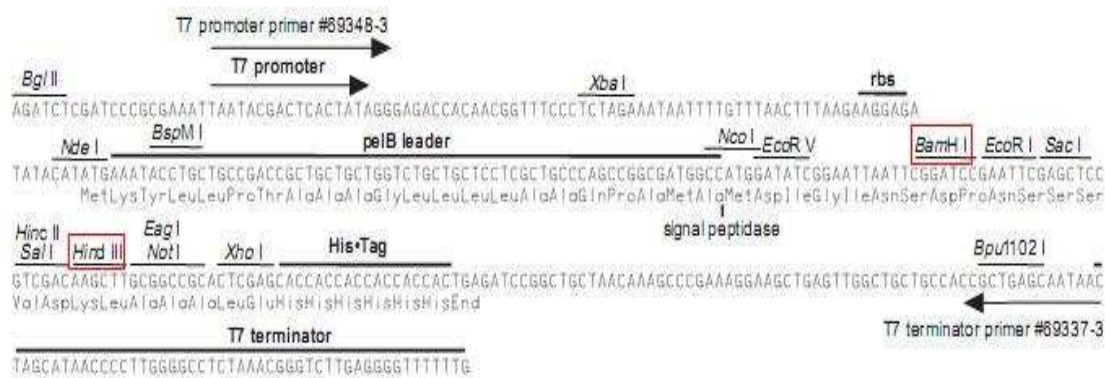
με την μέθοδο της επιλογής των μπλε/άσπρων αποικιών.

pET-20b(+) sequence landmarks	
T7 promoter	353-369
T7 transcription start	352
pelB coding sequence	224-289
Multiple cloning sites Nco I – Xho I	158-225
His*Tag cosing sequence	140-157
T7 terminator	26-72
pBR322 origin	1500
<i>bla</i> coding sequence`	2261-3118
f1 origin	3250-3705



ΕΙΚΟΝΑ 15: Οι σημαντικότερες αλληλουχίες του φορέα.

ΕΙΚΟΝΑ 16: Ο πλασμιδιακός φορέας pET-20b(+). Παρατίθεται ο χάρτης πέψης με τα διάφορα ένζυμα περιορισμού.



pET-20b(+) cloning/expression region

ΕΙΚΟΝΑ 17: Ο επαγωγέας της T7 RNA πολυμεράσης και ο πολυσυνδέτης του pET-20b vector. Στο εσωτερικό του πολυσυνδέτη εντοπίζονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamH I και Hind III, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας. Μετά τον πολυσυνδέτη ακολουθεί η αλληλουχία 6His.

2.3 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων (competent cells) για ηλεκτροδιάτρηση

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση ήταν τα DH5α και BL21 στελέχη της *Escherichia coli*. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία τους είναι η εξής:

- Χρησιμοποιούμε κύτταρα από stock γλυκερόλης και ενοφθαλμίζουμε 5ml αποστειρωμένο LB (προκαλλιέργεια). Επωάζουμε για 16 ώρες στους 37 °C.
- Με την προκαλλιέργεια ενοφθαλμίζουμε 2 δοχεία από 150 ml αποστειρωμένο LB και επωάζουμε για 3-4.5 ώρες, έως ότου η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών να είναι μεταξύ 0.6 – 0.9, μετρημένη στα 600nm.
- Τοποθετούμε τα δοχεία με τις καλλιέργειες σε πάγο και αφήνουμε για 30 λεπτά.
- Μοιράζουμε τις καλλιέργειες σε falcons και τα φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 6000 rpm στους 4 °C.
- Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο από το κάθε falcon και προσθέτουμε 25 ml παγωμένου νερού στο καθένα. Επαναδιαλύουμε πολύ καλά το ίζημα.

- Φυγοκέντρωση τα falcons για 10 λεπτά, 6000 rpm, 4 °C. Απόχυση υπερκλειμένου.
- Προσθήκη ξανά 25 ml παγωμένου νερού στο καθένα. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά, 6000 rpm, 4 °C. Απόχυση υπερκλειμένου.
- Προσθήκη 10ml παγωμένης γλυκερόλης 15% στο κάθε falcon και επαναδιάλυση του κάθε ιζήματος.
- Φυγοκέντρωση τα falcons για 10 λεπτά, 6000rpm, 4 °C. Απόχυση υπερκλειμένου.
- Ξανά προσθήκη 10 ml παγωμένης γλυκερόλης 15% στο κάθε falcon και επαναδιάλυση του κάθε ιζήματος. Φυγοκέντρωση τα falcons για 10 λεπτά, 6000rpm, 4 °C. Προσεκτική απόχυση υπερκλειμένου.
- Προσθήκη 400 μl παγωμένης γλυκερόλης 15% στο κάθε falcon και απαλή επαναδιάλυση ιζήματος.
- Μεταφορά 200 μl από το κάθε falcon σε παγωμένα eppendorfs και αποθήκευσή τους στους -80 °C.

2.4 Ενίσχυση του γονιδίου της Ροδανάσης με την τεχνική της PCR.

2.4.1 Απομόνωση βακτηριακού DNA.

Χρησιμοποιώντας κύτταρα από stock γλυκερόλης (-80 °C) αναπτύξαμε στερεές καλλιέργειες άγριου τύπου *P.entomophila* σε θρεπτικό μέσο LB άγαρ. Οι καλλιέργειες αυτές αναπτύχθηκαν στους 37 °C.

Στην συνέχεια χρησιμοποιήσαμε τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στις στερεές καλλιέργειες και κάναμε λύση των βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση του βακτηριακού (χρωμοσωμικού) DNA ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Προσθέτουμε 20 μl διαλύματος SDS-NaOH (lysis buffer) σε ένα eppendorf. Αυτό το διάλυμα θα προκαλέσει την λύση των κυττάρων. Το SDS είναι ένας ιοντικός αποδιατακτικός παράγοντας που διαλύει τα λιπιδικά συστατικά του κυτταρικού φακέλου και προκαλεί την μετουσίωση των κυτταρικών πρωτεϊνών. Το NaOH κάνει το διάλυμα αλκαλικό.

- Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα μαζεύουμε μικρή ποσότητα κυττάρων από τις αποικίες της *P.entomophila* και κατόπιν τοποθετούμε την οδοντογλυφίδα στο lysis buffer. Ανακινούμε καλά.
- Τοποθετούμε το erpenforf σε υδατόλουτρο στους 95 °C για 15 λεπτά.
- Προσθέτουμε 180 µl αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και αναδεύουμε.
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 4000 rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης ΔΕΝ μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf, για να αποφύγουμε την ανάμειξη του βακτηριακού DNA με τις κατακρημνισμένες πρωτεΐνες.
- Αποθήκευση στους -20 °C.

Το χρωμοσωμικό DNA που απομονώθηκε με την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ως DNA μήτρα για την PCR.

2.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Το γονίδιο της ροδανάσης βρίσκεται σε DNA μήτρα από όπου και θα ενισχυθεί με την αντίδραση της PCR. Προστέθηκαν: το χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου, το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης (Taq polymerase στο παρόν πείραμα, της Hytest), τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), οι εκκινητές (primers) και H₂O.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι:

- **PSEEN4960F2**
(5' – CTG GAG ATC GTG GAT GAC TGA – 3') και
- **PSEEN4960R2**
(5' – ACA AGC GGG ATT TCA TTG AG – 3')

Οι εκκινητές παραλαμβάνονται σε λυοφιλισμένη μορφή και διαλύθηκαν σε 1ml ddH₂O. Η συγκέντρωση της Taq πολυμεράσης (Hytest) είναι 5 u/µL. Η συγκέντρωση stock του buffer για την Taq είναι 10x, ενώ η τελική του συγκέντρωση

πρέπει να είναι 1x. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 150 μL . Πριν την τοποθέτηση του μείγματος (master mix) στην συσκευή της PCR πραγματοποιήθηκε καλή ανάμειξη όλων των συστατικών και μοίρασμα του μείγματος στα ειδικά PCR tubes (25 μL το καθένα). Οι ποσότητες των συστατικών καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης δίνονται παρακάτω:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (stock)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μL)
Buffer της Taq (10x)	15
Taq πολυμεράση (5 u/ μL)	1,2
dNTPs (25 mM)	1,5
Primer PSEEN4960F2 (100 pmol/ μL)	1,63
Primer PSEEN4960R2 (16 pmol/ μL)	3,75
DNA μήτρα	12
MgCl ₂ (50 mM)	6
ddH ₂ O	109
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	150

Παρατήρηση: Το χλωριούχο μαγνήσιο MgCl₂ απαιτείται για την καλύτερη δράση της Taq πολυμεράσης, η οποία παρουσιάζεται στους 72 °C.

Εισάγουμε τα δείγματα στην συσκευή της PCR και την ρυθμίζουμε ώστε να εκτελέσει 25 κύκλους. Τα στάδια του κάθε κύκλου είναι τα παρακάτω:

1. Αρχικό στάδιο αποδιάταξης: 2 min στους 95 °C
2. Αποδιάταξη: 20 sec στους 95 °C
3. Υβριδισμός των εκκινητών: 20 sec στους 54 °C
4. Επιμήκυνση: 1 min στους 72 °C
5. Επανάληψη των σταδίων 2, 3, και 4 24 φορές
6. Τελική επιμήκυνση: 2 min στους 72 °C

Μετά το τέλος της αντίδρασης τα προϊόντα της PCR διατηρούνται στους 4 °C. Ακολούθησε η ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.4.3 Οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Για τον διαχωρισμό των τμημάτων DNA και τον προσδιορισμό του μεγέθους του καθενός χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης.

Χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης 0,8% ή 1%, ανάλογα με το μέγεθος του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και να ανιχνεύσουμε. Ενδεικτικά η αντιστοιχία φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Ποσοστό αγαρόζης (%)	Μέγεθος μορίων DNA (kb)
0,3	60 – 5
0,6	20 – 1
0,7	10 – 0,8
0,9	7 – 0,5
1,2	6 – 0,4
1,5	4 – 0,2
2	3 – 0,1

Για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ηλεκτροφόρησης πήκτωμα αγαρόζης 0,8%, αφού το μέγεθος του γονιδίου της ροδανάσης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε είναι 810 ζεύγη βάσεων περίπου.

- Για 100 ml gel αγαρόζης 0,8% προσθέσαμε:
0,8 gr αγαρόζη + 10 ml TBE buffer 10x (Tris/Boric Acid/EDTA buffer, της εταιρίας Biorad) + 90 ml ddH₂O.

Το TBE θεωρείται πολύ καλό ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση διότι παρουσιάζει μικρή αντίσταση στο ηλεκτρικό ρεύμα και το DNA “τρέχει” ομαλά.

- Θερμάναμε το διάλυμα της αγαρόζης μέχρι να διαλυθεί ολόκληρη η ποσότητά της και να γίνει διαυγές. Αφήσαμε λίγο να κρυώσει και προσθέσαμε 10 μL βρωμιούχο αιθίδιο (stock 10 mg/ml).
- Τοποθετήσαμε το διάλυμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και το αφήσαμε να πήξει.
- Αφού έπηξε, η συσκευή πληρώθηκε με TBE buffer 10x μέχρι να καλυφθεί η πηκτή και φορτώθηκαν τα δείγματά μας στις ειδικές υποδοχές (πηγαδάκια) της πηκτής, αφού τους προσθέσαμε loading buffer 5x (BIO-RAD), μια ειδική ουσία που κρατάει τα δείγματα μέσα στα πηγαδάκια.

- Συνδέσαμε τα ηλεκτρόδια της ηλεκτροφορητικής συσκευής με την συσκευή τροφοδότησης έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής, όπου και κατευθύνονται τα δείγματα τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα.
- Εφαρμόστηκε τάση ~100V και μετά από 30-45 λεπτά έγινε δυνατή η ανίχνευση του DNA με την μορφή ζωνών κάτω από το υπεριώδες φως. Η ουσία που καθιστά δυνατή την ανίχνευση είναι το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο απορροφά στο υπεριώδες και του οποίου τα μόρια ενσωματώνονται στις διπλές έλικες του DNA.
- Ο προσδιορισμός του μεγέθους των ζωνών έγινε με σύγκρισή τους με τον μάρτυρα (marker) του μοριακού βάρους της εταιρίας Biolabs.

2.4.4 Καθαρισμός του προϊόντος της PCR

Μετά το πέρας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης το προϊόν καθαρίστηκε με την χρήση του QIAPREP PCR Purification Kit της QIAGEN.

Για τον καθαρισμό ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.

2.5 Κλωνοποίηση του γονιδίου της ροδανάσης

Πραγματοποιήθηκε με το StrataCloneTM PCR Cloning Kit. Το kit εκμεταλλεύεται την συνδυαστική δράση της τοποϊσομεράσης I από τον ιό *Vaccinia* και της Cre ρεκομπινάσης του βακτηριοφάγου P1.

Το StrataCloneTM vector mix περιέχει 2 τμήματα DNA, που το καθένα είναι φορτισμένο με την τοποϊσομεράση I στο ένα του άκρο και περιέχει αλληλουχία αναγνώρισης *loxP* στο άλλο άκρο. Τα άκρα της τοποϊσομεράσης έχουν ουρά ουριδίνης (U-overhang) κι έτσι το προϊόν της PCR ενισχυμένο με Taq πολυμεράση (έχει ουρά αδενίνης, A-overhang) συνδέεται ανάμεσα στα τμήματα του DNA με μια 5λεπτη αντίδραση σύνδεσης (ligation) μέσω ταίριασμα βάσεων A-U. Το γραμμικό μόριο DNA (τμήμα DNA – PCR product – τμήμα DNA) που προκύπτει μετασχηματίζεται κατόπιν στα δεκτικά κύτταρα του kit, τα οποία είναι ειδικά φτιαγμένα για να εκφράζουν την Cre ρεκομπινάση. Το ένζυμο Cre ρεκομπινάση καταλύει τον ανασυνδυασμό μεταξύ των 2 αλληλουχιών *loxP* και δημιουργείται έτσι το κυκλικό μόριο pSC-A το οποίο είναι ιδανικό για αναπαραγωγή σε καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο παρουσία αμπικιλίνης. Ο pSC-A vector περιέχει επίσης το γονίδιο *lacZ'* για διαχωρισμό μπλε-άσπρων αποικιών.

Η διαδικασία της κλωνοποίησης διεκπεραιώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.

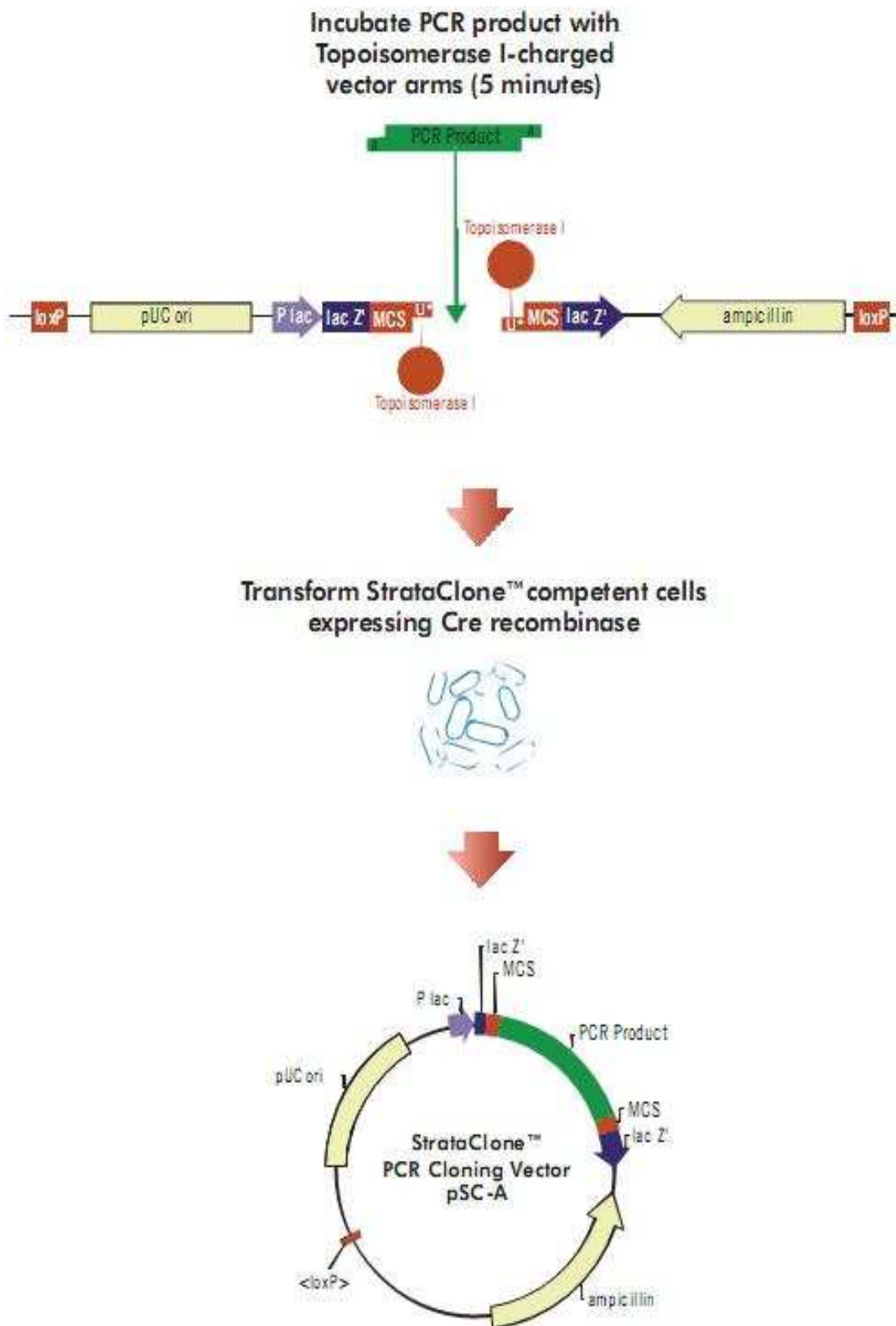
2.6 Μέθοδος επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών

Επιστρώνουμε τα κύτταρα που προέκυψαν από την κλωνοποίηση (περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pSC-A) σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB, αμπικιλίνη 100μg/ml και 20 μ/L X-gal (stock 40mg/ml σε DMF, διμεθυλοφορμαμίδη). Τα βάζουμε για επώαση στους 37 °C για 16 ώρες.

Οι αποικίες των βακτηρίων που μεγάλωσαν διαχωρίζονται σε μπλε και άσπρες αποικίες. Επιλέχθηκαν οι αποικίες από το στερεό υπόστρωμα που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Οι τελευταίες έχουν άσπρο χρώμα εξαιτίας του γονιδίου *lacZ'*, το οποίο καταργεί την δράση της β-γαλακτοσιδάσης να μεταβολίζει το X-gal κι έτσι τα βακτήρια σχηματίζουν άσπρες αποικίες. Τα βακτήρια που δεν έχουν πάρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αλλά άθικτο, σχηματίζουν μπλε αποικίες λόγω μεταβολισμού του X-gal. Βέβαια, κάποια βακτήρια που δεν έχουν πάρει καθόλου το πλασμίδιο δεν θα επιβιώσουν στο θρεπτικό μέσο, αφού δεν κατέχουν από μόνα τους τα γονίδια ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό, στην συγκεκριμένη περίπτωση την αμπικιλίνη.

Ενοφθαλμίζουμε τις άσπρες αποικίες σε υγρό, αποστειρωμένο LB και τις αφήνουμε όλη νύχτα στον αναδευτήρα στους 37 °C.

Παρασκευάστηκε stock γλυκερόλης των μετασχηματισμένων βακτηρίων.



ΕΙΚΟΝΑ 18: Μέθοδος κλωνοποίησης με το StrataClone™ PCR cloning kit

2.7 Επιβεβαίωση της επιτυχίας της κλωνοποίησης με πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

2.7.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini preparation)

Το επόμενο βήμα ήταν η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις υγρές καλλιέργειες των άσπρων αποικιών. Χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin Plasmid της εταιρίας MACHERY NAGEL. Ακολούθηθηκε η διαδικασία της απομόνωσης σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.

2.7.2 Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι τα βακτήρια έχουν όντως πάρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, εκτελούμε μια αντίδραση πέψης του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA με συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA μήκους 4 έως 8 νουκλεοτιδίων. Λέγονται ενδονουκλεάσες διότι κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου και όχι στα άκρα του και περιοριστικές διότι η δραστηριότητά τους περιορίζεται σε ξένο DNA.

Λόγω της συμπληρωματικότητας των αλυσίδων του DNA τα ένζυμα περιορισμού κόβουν και τις 2 αλυσίδες. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται είναι συνήθως παλίνδρομες, που σημαίνει ότι οι αλληλουχίες στις 2 αλυσίδες του DNA είναι ίδιες στο σημείο αναγνώρισης, ώστε μετά το κόψιμο να δημιουργούνται μονόκλωνες συμπληρωματικές ουρές στο DNA.

Για την συγκεκριμένη αντίδραση πέψης χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού Apa I και Sac I της New England Biolabs (NEB).

- Το ένζυμο Apa I αναγνωρίζει την αλληλουχία GGGCC/C και η συγκέντρωσή του είναι 50 u/μL. Η θερμοκρασία επώασής του είναι στους 37 °C και εμφανίζει την μέγιστη δραστηριότητά του στο buffer 4 της ίδιας εταιρίας.
- Το ένζυμο Sac I αναγνωρίζει την αλληλουχία GAGCT/C και η συγκέντρωσή του είναι 20 u/μL. Η θερμοκρασία επώασής του είναι στους 37 °C και εμφανίζει την μέγιστη δραστηριότητά του στα buffer 1 και 4 της ίδιας εταιρίας.

Για να πραγματοποιήσουμε την πέψη θα χρησιμοποιήσουμε το NEBuffer 4. Το buffer 4 είναι 10x συμπυκνωμένο και πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε τελική

συγκέντρωση 1x.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την αντίδραση της πέψης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (stock)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μL)
Buffer 4 (10x)	2
Apa I (50 u/μL)	1
Sac I (20 u/μL)	1
Plasmid DNA	8
ddH ₂ O	8
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20

Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων σε eppendorf, έγινε καλό vortex του δείγματος και spin down για μερικά δευτερόλεπτα.

Το δείγμα επωάστηκε για 2,5 ώρες στους 37 °C.

Ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.8 Αλληλούχηση (sequencing)

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στάλθηκε στην εταιρία MacroGen (Κορέα) για αλληλούχηση. Το αποτέλεσμα δεν ήταν ικανοποιητικό και αποφασίσαμε να επαναλάβουμε το πείραμα από την αρχή χρησιμοποιώντας νέους εκκινητές και καινούρια, υψηλής πιστότητας πολυμεράση.

2.9 Ενίσχυση του γονιδίου της ροδανάσης με την τεχνική της PCR, χρησιμοποιώντας νέους εκκινητές και υψηλής πιστότητας (High Fidelity) πολυμεράση

Το πείραμα ξεκίνησε από την αρχή, αυτή τη φορά με καινούρια, υψηλής πιστότητας πολυμεράση για να μειωθεί η πιθανότητα λάθους κατά την διάρκεια της αλυσιδωτής αντίδρασης.

2.9.1 Απομόνωση βακτηριακού DNA

Ως DNA μήτρα για την PCR χρησιμοποιήθηκε χρωμοσωμικό DNA που απομονώθηκε από στερεές καλλιέργειες του άγριου τύπου *Pseudomonas entomophila*. Η πορεία της απομόνωσης ήταν η ίδια με παραπάνω (βλ. 2.3.1).

2.9.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Προστέθηκαν: Το χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου *P. entomophila*, το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης, τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), οι εκκινητές (primers), και ddH₂O. Οι εκκινητές παραλαμβάνονται σε λυοφιλισμένη μορφή και διαλύθηκαν σε 1ml ddH₂O.

- Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι η PHUSION High Fidelity DNA Polymerase (FINNZYMES). Η συγκέντρωση του stock είναι 2 u/μL, ενώ χρησιμοποιήσαμε τελική συγκέντρωση 0.5 u/μL.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι:

1. PSEEN4960F2N



(5' – GAC CTA GGC TGG AGA TCG TGG ATG ACT GA – 3') ο οποίος περιέχει την θέση αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο BamH I (NEB) στο 5' άκρο και

2. PSEEN4960R2N



(5' – AGA AGC TTA CAA GCG GGA TTT CAT TGA G – 3') ο οποίος περιέχει την θέση αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο Hind III (NEB) στο 5' άκρο.

Σε κίτρινο πλαίσιο σημειώνονται οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamH I και Hind III (NEB).

- Το buffer της High Fidelity πολυμεράσης είναι 5x συμπυκνωμένο, ενώ χρησιμοποιήσαμε 1x τελική συγκέντρωση. Το buffer περιέχει MgCl₂ για αποδοτικότερη δράση της πολυμεράσης, οπότε δεν προσθέσαμε καθόλου στο master mix της PCR.
- Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 150 μl. Πριν την τοποθέτηση του μείγματος στην συσκευή της PCR πραγματοποιήθηκε καλή ανάμειξη όλων των συστατικών και μοίρασμα του μείγματος στα ειδικά PCR tubes (25 μL το καθένα). Οι ποσότητες των συστατικών καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης δίνονται παρακάτω.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (stock)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μL)
-----------------------	----------------

Buffer της Phusion πολυμεράσης (5x)	30
Phusion HiFi DNA Polymerase (2 u/μL)	1,5
dNTPs (25 mM)	1,5
Primer PSEEN4960F2N (6,7 μM)	8,95
Primer PSEEN4960R2N (23,9 μM)	2,5
DNA μήτρα	12
ddH ₂ O	93,55
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	150

Εισάγουμε τα δείγματα στην συσκευή της PCR και την ρυθμίζουμε ώστε να εκτελέσει 30 κύκλους. Τα στάδια του κάθε κύκλου είναι τα παρακάτω:

7. Αρχικό στάδιο αποδιάταξης: 2 min στους 98 °C

8. Αποδιάταξη: 20 sec στους 98 °C

9. Υβριδισμός των εκκινητών: 20 sec στους 65 °C

10.Επιμήκυνση: 30 sec στους 72 °C

11.Επανάληψη των σταδίων 2, 3, και 4 29 φορές

12.Τελική επιμήκυνση: 30 min στους 72 °C

Μετά το τέλος της αντίδρασης τα προϊόντα της PCR διατηρούνται στους 4 °C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η High Fidelity Polymerase έχει την ιδιότητα να παράγει τμήματα με τυφλά άκρα (bland ends), κάτι το οποίο είναι ανεπιθύμητο γιατί αυτά τα τμήματα θα χρησιμοποιηθούν για κλωνοποίηση με το StrataClone™ kit. Το kit αυτό πραγματοποιεί την αντίδραση σύνδεσης (ligation) του προϊόντος της PCR στον ειδικό φορέα μέσω ταιριάσματος βάσεων A-U, επομένως είναι απαραίτητο τα τμήματα του DNA από την PCR να έχουν ουρά αδερίνης στα άκρα τους.

Για τον σκοπό αυτό, λίγο πριν την έναρξη του τελικού σταδίου της επιμήκυνσης στην διαδικασία της PCR, προσθέσαμε στο κάθε PCR tube των 25 μL από 1μL Taq πολυμεράση (HyTest, stock 5 u/μL). Η Taq πολυμεράση έχει την ιδιότητα κατά την διάρκεια της ενίσχυσης των τμημάτων DNA να προσθέτει αδερίνη στα άκρα τους, δημιουργώντας έτσι την ουρά αδερίνης (A-overhang) που είναι απαραίτητη για την A-U κλωνοποίηση.

Προκειμένου να δοθεί ο απαραίτητος χρόνος στην Taq πολυμεράση να δράσει, το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης είναι ιδιαίτερα παρατεταμένο (30 λεπτά, ενώ θα αρκούσανε 5).

2.10 Καθαρισμός του προϊόντος της PCR από την πηκτή αγαρόζης

Μετά το πέρας της PCR φορτώθηκε όλη η ποσότητα του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης και ηλεκτροφορήθηκε στα 100V μέχρι να τρέξει αρκετά το δείγμα.

Κατόπιν έγινε εξαγωγή του τμήματος DNA που αντιστοιχεί στο επιθυμητό γονίδιο (ροδανάση) με την βοήθεια ενός αποστειρωμένου ξυραφιού. Η εξαγωγή πραγματοποιήθηκε με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν ο όγκος της πηκτής.

Χρησιμοποιήθηκε έπειτα το GEL EXTRACTION kit της QIAGEN για τον καθαρισμό του γονιδίου. Η διαδικασία διεκπεραιώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.

2.11 Κλωνοποίηση του γονιδίου της ροδανάσης

Πραγματοποιήθηκε με το StrataClone™ PCR Cloning Kit. Η διαδικασία της κλωνοποίησης διεκπεραιώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή (βλ. 2.4).

Επιστρώνουμε τα κύτταρα που προέκυψαν από την κλωνοποίηση (περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pSC-A) σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB, αμικικίνη 100μg/ml και 20 μ/L X-gal (stock 40mg/ml σε DMF). Τα βάζουμε για επώαση στους 37 °C για 16 ώρες.

Οι αποικίες των βακτηρίων που μεγάλωσαν διαχωρίζονται σε μπλε και άσπρες αποικίες. Επιλέχθηκαν οι αποικίες από το στερεό υπόστρωμα που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (άσπρες). Ενοφθαλμίζουμε τις άσπρες αποικίες σε υγρό, αποστειρωμένο LB και τις αφήνουμε όλη νύχτα στον αναδευτήρα στους 37 °C.

2.12 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από τις υγρές καλλιέργειες βακτηρίων που προήλθαν από άσπρες αποικίες. Χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin Plasmid της εταιρίας MACHEREY NAGEL. Ακολούθηθηκε η διαδικασία της απομόνωσης σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.

2.13 Αντίδραση διπλής πέψης

Το επόμενο βήμα ήταν η πέψη του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA, καθώς και του πλασμιδιακού φορέα pET-20b(+), με την χρήση των περιοριστικών ενζύμων BamH I και Hind III (NEB, New England Biolabs).

- Το ένζυμο BamH I αναγνωρίζει την αλληλουχία G/GATCC και η συγκέντρωσή του είναι 20 u/μL. Η θερμοκρασία επώασής του είναι στους 37 °C και εμφανίζει την μέγιστη δραστηριότητά του στα buffer 2, 3 και 4 της ίδιας εταιρίας.
- Το ένζυμο Hind III αναγνωρίζει την αλληλουχία A/AGCTT και η συγκέντρωσή του είναι 20 u/μL. Η θερμοκρασία επώασής του είναι στους 37 °C και εμφανίζει την μέγιστη δραστηριότητά του στο buffer 2 της ίδιας εταιρίας.

Για να πραγματοποιήσουμε την πέψη θα χρησιμοποιήσουμε το NEBuffer 2. Το buffer 2 είναι 10x συμπυκνωμένο και πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε τελική συγκέντρωση 1x.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τις δύο πέψεις δίνονται παρακάτω.

ΠΕΨΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA (ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pSC-A)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (stock)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μ/L)
Buffer 2 (10x)	4,5
BamH I (20 u/μL)	2
Hind III (20 u/μL)	2
Plasmid DNA	35
ddH ₂ O	1,5
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	45

Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων σε eppendorf, έγινε καλό vortex του δείγματος και spin down για μερικά δευτερόλεπτα. Το δείγμα επώαστηκε για 3 ώρες στους 37 °C.

Παρατηρούμε ότι χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη η ποσότητα του απομονωμένου DNA κι αυτό διότι θα ακολουθήσει η εξαγωγή του ενθέματος (γονίδιο της ροδανάσης) από το πήκτωμα και ο καθαρισμός του.

ΠΕΨΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ pET-20b(+)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (stock)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μL)
Buffer 2 (10x)	3
BamH I (20 u/μL)	1,25
Hind III (20 u/μL)	1,25
pET-20b(+) vector	20
ddH ₂ O	4,5
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	30

Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων σε eppendorf, έγινε καλό vortex του δείγματος και spin down για μερικά δευτερόλεπτα. Το δείγμα επωάστηκε για 3 ώρες στους 37 °C.

2.14 Καθαρισμός των προϊόντων των δύο πέψεων

- Μετά το πέρας της πέψης του πλασμιδιακού DNA (πλασμίδιο pSC-A το οποίο περιέχει το ένθεμα-γονίδιο της ροδανάσης), φορτώθηκε όλη η ποσότητα του προϊόντος σε πηκτή αгарόζης και ηλεκτροφορήθηκε στα 100V μέχρι να τρέξει αρκετά το δείγμα.

Κατόπιν έγινε εξαγωγή του τμήματος DNA που αντιστοιχεί στο επιθυμητό γονίδιο με την βοήθεια ενός αποστειρωμένου ξυραφιού. Η εξαγωγή πραγματοποιήθηκε με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν ο όγκος της πηκτής.

Χρησιμοποιήθηκε έπειτα το GEL EXTRACTION kit της QIAGEN για τον καθαρισμό του γονιδίου. Η διαδικασία διεκπεραιώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.

- Μετά το πέρας της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pET-20b(+) το προϊόν καθαρίστηκε με την χρήση του QIAPREP PCR Purification Kit της QIAGEN.

Για τον καθαρισμό ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.

2.15 Αντίδραση δεσμάσης (ligation)

Το επόμενο βήμα ήταν η σύνδεση των μορίων του κομμένου γονιδίου της ροδανάσης και του κομμένου φορέα pET-20b(+).

Η σύνδεση ενός τμήματος DNA με ένα πλασμιδιακό φορέα περιλαμβάνει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των φωσφορικών ομάδων στα 5' άκρα και των υδροξυλομάδων στα 3' άκρα των μορίων DNA. Ο σχηματισμός καταλύεται από την T4 DNA λιγάση (δεσμάση).

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύνδεσης μεταξύ ενός επιθυμητού γονιδίου και ενός φορέα, είναι απαραίτητο τα δύο αυτά αντιδραστήρια να βρίσκονται στην καθαρότερη δυνατή κατάσταση. Αυτό επιτυγχάνεται και στις δύο περιπτώσεις με τις μεθόδους καθαρισμού που προαναφέρθηκαν.

Για την αντίδραση σύνδεσης (δεσμάσης) στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση της FERMENTAS. Έχει ενεργότητα 1000 u και η συγκέντρωση της είναι 5 u/μL.

Ο λόγος του ενθέματος προς τον φορέα πρέπει να είναι για την συγκεκριμένη αντίδραση 3:1. Το buffer της λιγάσης είναι συμπυκνωμένο 10x, ενώ η τελική του συγκέντρωση πρέπει να είναι 1x.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση δίνονται παρακάτω:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (stock)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μL)
Ligase buffer (10x)	1
Ένθεμα ροδανάσης	3
pET-20b(+) vector	1
T4 DNA ligase (5 u/μL)	1
dATP (100 mM)	1
ddH ₂ O	3
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	10

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση auto-ligation με όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια εκτός του ενθέματος, για την επιβεβαίωση της δραστηριότητας του ενζύμου της λιγάσης. Για το auto-ligation αντί για τον pET-20b(+) φορέα χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας PUCP20 κομμένος με το ένζυμο Sac I (NEB).

Σημειώνεται ότι η χρήση μικρής ποσότητας dATP στην αντίδραση σύνδεσης βοηθάει την λιγάση να δρα σωστά και αποτελεσματικά.

Επωάζουμε τα δείγματα του ligation και auto-ligation στους 4 °C για όλη την νύχτα.

2.16 Μετασχηματισμός κυττάρων DH5α με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)

Ακολούθησε ο μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων DH5α μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Το πρωτόκολλο της διαδικασίας είναι το εξής:

- Τα δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5α (200 μ L το κάθε tube) από το stock (-80°C) μεταφέρονται σε πάγο και αφήνονται να ξεπαγώσουν καλά. Τοποθετούμε επίσης στον πάγο τις ειδικές κυψελίδες της ηλεκτροδιάτρησης.
- Προσθέτουμε τα 10 μ L του προϊόντος του ligation (construct pET-20b + γονίδιο ροδανάσης) στο tube των 200 μ L των δεκτικών κυττάρων. Παίρνουμε όλη την ποσότητα και την μεταφέρουμε στην κυψελίδα, την οποία έχουμε φροντίσει να καθαρίσουμε από την υγρασία.
- Επωάζουμε στον πάγο για λίγα λεπτά και κατόπιν κάνουμε την ηλεκτροδιάτρηση στην ειδική συσκευή στα 2.5 kV.
- Αμέσως μετά την ηλεκτροδιάτρηση μεταφέρουμε 600 μ L φρέσκο αποστειρωμένο LB στην κυψελίδα και αναμειγνύουμε. Αυτό το βήμα πρέπει να γίνει πολύ γρήγορα, γιατί σε αυτό το σημείο χάνονται πολλά βακτηριακά κύτταρα λόγω του sock στο οποίο υποβάλλονται.
- Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε αποστειρωμένο erpendorf και τα βάζουμε για επώαση για 1 ώρα στους 37°C .
- Μετά την επώαση, επιστρώνουμε 100 μ L από τα μετασχηματισμένα κύτταρα σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό μέσο. Το θρεπτικό αυτό μέσο είναι LB με το αντιβιοτικό αμικλίνη σε τελική συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$.
- Επωάζουμε τις καλλιέργειες στους 37°C για όλη την νύχτα.
- Παρασκευάστηκε stock γλυκερόλης των μετασχηματισμένων βακτηρίων.

2.17 Επιβεβαίωση της επιτυχίας του μετασχηματισμού

Στα τρυβλία με το στερεό θρεπτικό μέσο αναπτύχθηκαν αποικίες βακτηρίων. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι τα μετασχηματισμένα αυτά βακτήρια έχουν όντως το πλασμίδιο – construct (pET-20b + γονίδιο ροδανάσης), απομονώσαμε πλασμιδιακό DNA από αυτά και το κόψαμε με τα ένζυμα περιορισμού BamH I και Hind III.

- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin Plasmid της εταιρίας MACHEREY NAGEL. Ακολούθησε η διαδικασία της απομόνωσης σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.

- Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα BamH I και Hind III (NEB, New England Biolabs). Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την πέψη δίνονται παρακάτω:

ΑΝΤΙΑΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (stock)	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μ/L)
Buffer 2 (10x)	2
BamH I (20 u/μL)	1
Hind III (20 u/μL)	1
Plasmid DNA	15
ddH ₂ O	1
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20

Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων σε eppendorf, έγινε καλό vortex του δείγματος και spin down για μερικά δευτερόλεπτα. Το δείγμα επωάστηκε για 3 ώρες στους 37 °C.

Η πέψη φορτώθηκε κατόπιν σε πήκτωμα αгарόζης 0.8% και ηλεκτροφορήθηκε στα 100V.

2.18 Αλληλούχηση

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στάλθηκε για αλληλούχηση στην εταιρία MacroGen (Κορέα). Αυτή τη φορά τα αποτελέσματα έδειξαν απόλυτη ταύτιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου με σύγκρισή της με την αλληλουχία του γονιδίου PSEEN4960 της *Pseudomonas entomophila*.

2.19 Μετασχηματισμός BL21(DE3) κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Το επόμενο βήμα ήταν ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων BL21(DE3) με την διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης. Τα βακτήρια αυτά σε συνδυασμό με τους πλασμιδιακούς φορείς pET-20b(+) αποτελούν ιδανικούς ξενιστές για την έκφραση του ανασυνδυασμένου γονιδίου.

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1,5 μ L από το πλασμίδιο – construct στο tube με τα 200 μ L κυττάρων BL21 και η διαδικασία συνεχίστηκε όπως παραπάνω (βλ. 2.16).

Παρασκευάστηκε stock γλυκερόλης των μετασχηματισμένων βακτηρίων.

2.20 Προσπάθεια υπερέκφρασης της πρωτεΐνης

A. Έλεγχος συνθηκών υπερέκφρασης της πρωτεΐνης ροδανάσης

Για την βέλτιστη έκφραση του ενζύμου της ροδανάσης απαιτούνται η κατάλληλη θερμοκρασία, χρόνος επώασης και συγκέντρωση IPTG. Με την ακόλουθη διαδικασία γίνεται η προσπάθεια εντοπισμού αυτών των συνθηκών, με απώτερο σκοπό την έκφραση του ενζύμου σε μεγάλη κλίμακα και παραλαβή μεγάλης ποσότητας της πρωτεΐνης.

Το IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) είναι ένα αντιδραστήριο το οποίο προάγει αποτελεσματικά την μεταγραφή γονιδίων-στόχων και την έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Παρασκευάστηκε σε stock 100mM.

Το πρωτόκολλο της διαδικασίας δίνεται παρακάτω:

- Παρασκευάστηκε υγρή καλλιέργεια κυττάρων BL21(DE3), με ενοφθαλμισμό βακτηρίων από το stock γλυκερόλης σε 5 ml φρέσκου, αποστειρωμένου LB broth με αμπικλίνη 50 μ g/ml. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37 $^{\circ}$ C για 16 ώρες.

- Ενοφθαλμίσαμε 200 ml φρέσκου, αποστειρωμένου LB με αμπικιλίνη 50 µg/ml με 1,5 ml από την υγρή καλλιέργεια και επωάζουμε για 3-4.5 ώρες, έως ότου η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών να είναι περίπου 0.5, μετρημένη στα 600nm.
- Κατόπιν η καλλιέργεια μοιράστηκε σε 6 αποστειρωμένα δοχεία, από 20 ml το καθένα. Στο κάθε δοχείο προστέθηκε ορισμένη ποσότητα IPTG και το καθένα επώαστηκε σε διαφορετική θερμοκρασία και με διαφορετικό χρόνο επώασης.

Προστέθηκε επίσης αμπικιλίνη 25 µg/ml (μικρή ποσότητα, διότι ένα ποσοστό της αμπικιλίνης αποδομήθηκε με την επώαση των 4.5 ωρών).

Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται οι συνθήκες και η συγκέντρωση του IPTG για τα 6 δοχεία:

Δοχείο	1	2	3	4	5	6
IPTG (τελική συγκέντρωση)	0.5mM	1mM	0.5mM	1mM	Control	Control
Χρόνος επώασης	5 ώρες	5 ώρες	O/N	O/N	5 ώρες	O/N
Θερμοκρασία	37 °C	37 °C	R/T	R/T	37 °C	R/T

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ο χρόνος επώασης, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση IPTG 100mM για το κάθε δοχείο. Σε 2 δοχεία δεν προστέθηκε καθόλου IPTG (control), ώστε να συγκρίνουμε στο SDS-PAGE gel την διαφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης.

ΣΗΜ: O/N = για όλη την νύχτα, R/T = θερμοκρασία δωματίου.

- Μετά την επώαση των καλλιεργειών, πραγματοποιήθηκε η μεταφορά τους σε παγωμένα (-20 °C) falcons. Συλλέξαμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση των falcons για 15 λεπτά στις 4000 rpm στους 4 °C και απόχυση του υπερκλειμένου.
- Έγινε επαναδιάλυση των κυττάρων με πρόσθεση 1 ml sonication buffer στο κάθε falcon. Το buffer αυτό αποτελείται από PBS (10x), PMSF (stock 100mM, τελική 1 mM) και λυσοζύμη.

Το PBS (Phosphate buffered saline, της εταιρίας Sigma) περιέχει άλατα (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) και είναι ρυθμιστικό του pH.

Το PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, της εταιρίας Sigma) είναι αναστολέας πρωτεασών. Προστατεύει έτσι τις πρωτεΐνες.

Η λυσοζύμη διασπά τους γλυκοζιτικούς δεσμούς της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος και βοηθάει έτσι στην λύση των κυττάρων.

Πολύ μικρή ποσότητα λυσοζύμης προστέθηκε στο διάλυμα PBS/PMSF με το μάτι.

- Μεταφέραμε σε eppendorfs, τα οποία βυθίσαμε σε πάγο και αφήσαμε για 30 λεπτά.
- Πραγματοποιήθηκε η διαδικασία του sonication, δηλαδή λύση των κυτταρικών μεμβρανών με ειδική συσκευή που παράγει υπερήχους, μέχρι να διαφανοποιηθεί το μείγμα
- Φυγοκέντρωση για 30 λεπτά τα eppendorfs , στους 4 °C, στις 12000 rpm.
- Διαχωρίσαμε τα υπερκείμενα από το κάθε eppendorf και τα μεταφέραμε σε νέα eppendorfs. Κρατήσαμε τα ιζήματα.
- Ηλεκτροφορήσαμε τα υπερκείμενα και τα ιζήματα σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

B. Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου 12%. Αυτή, αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, την πηκτή διαχωρισμού (separating gel) και την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel).

- Παρασκευάστηκε πήκτωμα διαχωρισμού 12%. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Απιονισμένο H ₂ O	4,9 ml
Ακρυλαμίδιο	6 ml
Tris - HCl (pH 8,8)	3,8 ml
SDS 10%	0,15 ml
APS 10%	0,15 ml

TEMED	6 μ L
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	15 ml

Τα APS (ammonium persulfate) και TEMED (τετραμεθυλοδιαμίνη) προστέθηκαν στο τέλος καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου.

- Φορτώσαμε το μείγμα στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθέσαμε μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης στην κορυφή για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας της πηκτής.
- Αφού έπηψε αφαιρέθηκε η ισοπροπανόλη με την βοήθεια διηθητικού χαρτιού και προστέθηκε στην συσκευή, πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού, ένα δεύτερο πήκτωμα που ονομάζεται πήκτωμα επιστοίβαξης 4%. Τα αντιδραστήρια για την κατασκευή δίνονται παρακάτω:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
Απιονισμένο H ₂ O	3,4 ml
Ακρυλαμίδιο	0,83 ml
Tris - HCl (pH 6,8)	0,63 ml
SDS 10%	0,05 ml
APS	0,05 ml
TEMED	5 μ L
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	5 ml

- Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για την φόρτωση στην πηκτή με προσθήκη loading buffer (2x) και βράσιμο στους 100 °C για μερικά λεπτά.
- Φορτώθηκαν τα δείγματα καθώς και ο μάρτυρας μοριακού βάρους (Protein marker, Broad Range 2-212kDa, Biolabs) στις ειδικές υποδοχές της πηκτής και προστέθηκε το ειδικό buffer ηλεκτροφόρησης (Tris / γλυκίνη / SDS, 10x).
- Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με εφαρμογή ρεύματος 120V για 1 ώρα περίπου.

- Το πήκτωμα χρωματίστηκε κατόπιν με διάλυμα coomasie (χρωστική κυανούν coomasie 0,25%, οξικό οξύ 10%, μεθανόλη 45%) για 15 λεπτά.
- Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με αποχρωματισμό της πηκτής με το διάλυμα αποχρωματισμού (οξικό οξύ 10%, μεθανόλη 45%).

Γ. Έλεγχος της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης με εφαρμογή νέων συνθηκών

Το πείραμα της εύρεσης των κατάλληλων συνθηκών της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης επαναλήφθηκε, αυτή τη φορά με νέες συνθήκες.

- Παρασκευάστηκε υγρή καλλιέργεια κυττάρων BL21(DE3), με ενοφθαλμισμό βακτηρίων από το stock γλυκερόλης σε 5 ml φρέσκου, αποστειρωμένου LB broth με αμπικλίνη 50 µg/ml. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37 °C για 16 ώρες.
- Ενοφθαλμίσαμε 430 ml φρέσκου, αποστειρωμένου LB με αμπικλίνη 50 µg/ml με 4,3 ml από την υγρή καλλιέργεια και επώασαμε για 3-4.5 ώρες, έως ότου η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών να είναι περίπου 0.5, μετρημένη στα 600nm. 10 ml από αυτή την καλλιέργεια δεν θα επωαστούν περαιτέρω και θα χρησιμοποιηθούν ως το συνολικό control της αντίδρασης.
- Κατόπιν η καλλιέργεια μοιράστηκε σε 4 αποστειρωμένα δοχεία, από 100 ml το καθένα. Στο κάθε δοχείο προστέθηκε ορισμένη ποσότητα IPTG και το καθένα επώαστηκε σε διαφορετική θερμοκρασία και με διαφορετικό χρόνο επώασης.

Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται οι συνθήκες και η συγκέντρωση του IPTG για τα 4 δοχεία. Σημείωση: Το IPTG είναι από καινούριο stock 0,5M.

Δοχείο	1	2	3	4
IPTG (τελική συγκέντρωση)	0.5mM	0,5mM	0.5mM	0,5mM
Χρόνος επώασης	5 ώρες	O/N	5 ώρες	O/N
Θερμοκρασία	37 °C	37 °C	R/T	R/T

Χρησιμοποιήθηκαν 3 controls των 10 ml για αυτό το πείραμα:

- Ένα συνολικό control, χωρίς IPTG και χωρίς περεταίρω επώαση πέρα από την αρχική που είδαμε οπτική πυκνότητα 0.5.
- Ένα χωρίς IPTG, που επώαστηκε στους 37 °C για όλη την νύχτα.
- Ένα χωρίς IPTG, που επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για όλη την νύχτα.

Το πείραμα έυρεσης των συνθηκών συνεχίστηκε όπως παραπάνω (Βλ. **2.20 A** και **B**).

Δ. Καθαρισμός πρωτεΐνης με στήλη νικελίου.

Ο πλασμιδιακός φορέας pET-20b(+) φέρει μια αλληλουχία 6 His στο C-τελικό του άκρο. Η πρωτεΐνη ροδανάση που προκύπτει από την έκφραση του γονιδιώματος του ανασυνδυασμένου βακτηρίου λοιπόν φέρει μια ουρά 6 ιστιδινών στο C-καρβοξυτελικό της άκρο κι έτσι μπορεί να καθαριστεί με την τη χρήση στήλης που περιέχει το μεταλλοϊόν νικέλιο. Η πρωτεΐνη περνάει μέσα από στήλη που περιέχει καθηλωμένα ιόντα νικελίου, τα οποία προσδένονται ισχυρά στην πολυιστιδινική ουρά, συγκρατώντας έτσι την πρωτεΐνη στο εσωτερικό της στήλης. Όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που δεν περιέχουν ιστιδίνες στο C-τελικό τους άκρο περνάνε μέσα από την στήλη χωρίς συγκράτηση στο εσωτερικό της.

Η πρωτεΐνη κατόπιν εκλούεται με ιμιδαζόλιο, το οποίο ανταγωνίζεται τις ιστιδίνες για την σύνδεση στο νικέλιο και γίνεται έτσι η παραλαβή της πρωτεΐνης από την στήλη.

Η διαδικασία καθαρισμού της ροδανάσης με στήλη νικελίου ήταν η εξής:

- Εξισορρόπηση της στήλης: Προσθέσαμε PBS (1x) σε 200 μ L στήλης νικελίου, ανακινήσαμε καλά και φυγοκεντρήσαμε για 1 λεπτό στις 13000 rpm. Αφαιρέσαμε προσεκτικά το υπερκείμενο και επαναλάβαμε άλλες 3 φορές.
- Σε σύριγγα που έχει επενδυθεί με υαλοβάμβακα στον πάτο της (λειτουργεί ως στεγανό της στήλης) έγινε η προσθήκη της στήλης.
- Προσθέσαμε τα υπερκείμενα από το προηγούμενο πείραμα στην στήλη.
- Επώασαμε την στήλη σε πάγο (4 °C) με ταυτόχρονη ανάδευση για όλη την νύχτα, ώστε να γίνει η δέσμευση της πρωτεΐνης στην στήλη.
- Φυγοκέντρηση της στήλης για 2 λεπτά, 13000 rpm. Το υπερκείμενο είναι το

flow-through, το οποίο περιέχει όλες τις πρωτεΐνες που δεν συγκρατήθηκαν από την στήλη. Τοποθετήθηκε το flow-through σε eppendorf.

- Έγινε κατόπιν η πλύση της στήλης με PBS (1x) για να απορριφθούν τυχόν πρωτεΐνες μικρής συγγένειας που έχουν συνδεθεί στην στήλη. Έγιναν 6 πλύσεις.
- Έκλουση της στήλης με διάλυμα ιμιδαζολίου / PBS (0.4 gr ιμιδαζόλιο σε 20 ml PBS 1x). Προσεκτική ανακίνηση και φυγοκέντρωση για 2 λεπτά, 13000 rpm. Τοποθέτηση της έκλουσης σε eppendorf. Έγιναν 6 εκλούσεις.
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου του flow-through, των πλύσεων και των εκλούσεων. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται για να διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται στις εκλούσεις και όχι στις πλύσεις ή το flow-through.

Ε. Τεχνική ανοσοαποτύπωσης τύπου WESTERN.

Για την επιβεβαίωση των ζωνών στην πηκτή ακρυλαμιδίου που αντιπροσωπεύουν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες, γίνεται μεταφορά τους από το αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF με την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού σε αυτές. Οι πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν αρνητικό φορτίο λόγω της σύνδεσής τους με το SDS, υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κινούνται προς την άνοδο. Έτσι, μεταφέρονται διαμέσου της πηκτής και καθιλώνονται στο πλέγμα της μεμβράνης με την βοήθεια υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται η ανίχνευση των καθηλωμένων πρωτεϊνών με την χρήση κατάλληλων αντισωμάτων.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Μια μεμβράνη PVDF, ίδιων διαστάσεων με το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ενεργοποιήθηκε με εμβάπτιση για 5 λεπτά σε μεθανόλη και στην συνέχεια εξισορροπήθηκε στο διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer, Tris / γλυκίνη / μεθανόλη). Στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίστηκε και το πήκτωμα καθώς και 6 χαρτιά τύπου Whatmann 3MM και 2 σφουγγαράκια.
- Ακολούθησε η διάταξη της μεταφοράς που αποτελείται κατά σειρά από: 1 σφουγγαράκι, 3 υγρά χαρτιά τύπου Whatmann, το πήκτωμα

πολυακρυλαμιδίου, την μεμβράνη, 3 υγρά χαρτιά τύπου Whatmann και άλλο 1 σφουγγαράκι. Η διάταξη αυτή τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, με τέτοιο τρόπο ώστε η μεμβράνη να βρίσκεται προς την πλευρά της ανόδου. Η μεταφορά γίνεται στα 150V για 1,5 ώρα.

- Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη επώαστηκε σε διάλυμα μη ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών (blocking buffer) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το blocking buffer συνίσταται από 2.5gr σκόνης άπαχου γάλακτος σε 50ml PBS (1x).
- Η μεμβράνη ξεπλύθηκε δύο φορές με PBS (1x) και έπειτα επώαστηκε με το μονοκλωνικό αντίσωμα (Anti-His HRP, mouse, της εταιρίας AbD serotec) το οποίο είχε διαλυθεί σε διάλυμα μη ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών, το οποίο αναγνωρίζει την υπό μελέτη καθηλωμένη πρωτεΐνη, για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS (1x). Το αντίσωμα αναγνωρίζει και δεσμεύει τις ιστιδίνες της πρωτεΐνης και είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (horseradish peroxidase) που σαν υπόστρωμα έχει την χλωροναφθόλη. Προκειμένου να γίνει η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών που είναι δεσμευμένες με το αντίσωμα, η μεμβράνη επώαστηκε σε διάλυμα εμφάνισης το οποίο περιείχε χλωροναφθόλη διαλυμένη σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 0.5g/ml και στο οποίο προστέθηκε H_2O_2 30%. Η χλωροναφθόλη οξειδώνεται από την υπεροξειδάση HRP παρουσία H_2O_2 , δίνοντας ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα στις περιοχές που είναι δεσμευμένο το δεύτερο αντίσωμα.
- Για να τερματιστεί η αντίδραση, η μεμβράνη ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας, η οποία έχει ως στόχο την κλωνοποίηση του γονιδίου της ροδανάσης του βακτηρίου της *Pseudomonas entomophila* και την υπερέκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pET-20b(+), ένας από του πιο αποτελεσματικούς πλασμιδιακούς φορείς για κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Η πορεία του πειράματος περιλαμβάνει την κλωνοποίηση του γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα (στην συγκεκριμένη περίπτωση τον φορέα pSC-A του StrataCloneTM PCR Cloning kit) ο οποίος δεν περιέχει το γονίδιο της T7 πολυμεράσης, ώστε να αποκλειστεί η πλασμιδιακή αστάθεια εξαιτίας της παραγωγής πρωτεϊνών, πιθανώς τοξικών για το κύτταρο ξενιστή. Ακολούθησε η υποκλωνοποίηση (subcloning) στον pET-20b και η προσπάθεια για την έκφραση του ενζύμου της ροδανάσης.

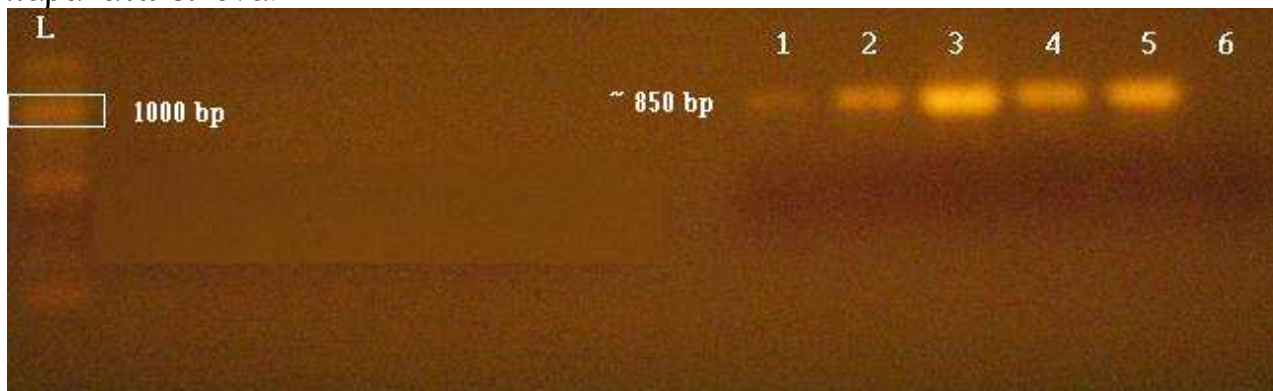
Σε αυτό το κεφάλαιο παρατίθενται τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας και η πορεία γενικά του πειράματος με χρονολογική διαδοχή.

3.1 Ενίσχυση του γονιδίου της ροδανάσης με την τεχνική της PCR

Το αρχικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας ήταν η πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με την χρήση της Taq πολυμεράσης (Hytest, UK) για την ενίσχυση του γονιδίου της ροδανάσης του βακτηρίου

Pseudomonas entomophila. Ως DNA μήτρα χρησιμοποιήθηκε χρωμοσωμικό DNA που απομονώθηκε από στερεές καλλιέργειες του άγριου τύπου του βακτηρίου. Ο τελικός όγκος της PCR αντίδρασης ήταν 25 μ L και του master mix 150 μ L. Το master mix μοιράστηκε σε 5 PCR tubes. Ένα 6ο tube περιείχε το αρνητικό (negative) control της αντίδρασης, δηλαδή όλα τα αντιδραστήρια πλην του DNA. Το αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε για να σιγουρευτούμε ότι κατά την προετοιμασία του μείγματος της PCR δεν υπήρχε επιμόλυνση με ξένο DNA.

Μετά την ολοκλήρωση της PCR έγινε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% στα 100V. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



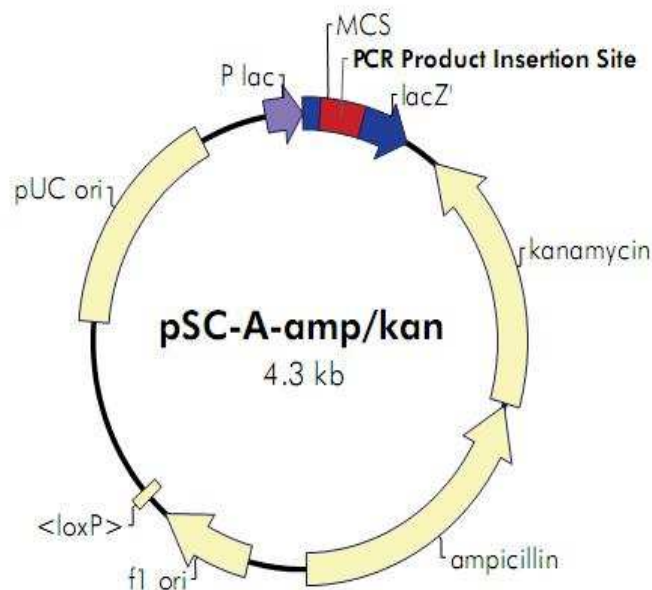
ΕΙΚΟΝΑ 19: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR του γονιδίου της ροδανάσης. Και οι πέντε (1,2,3,4,5) αντιδράσεις έδωσαν ζώνες στο ίδιο μοριακό βάρος, το οποίο αντιστοιχεί στα 850 ζεύγη βάσεων περίπου (810 bp το γονίδιο και 21+20 bp οι εκκινητές). Σημειώνεται στην εικόνα η ζώνη του μάρτυρα ποριακού βάρους (Ladder, L) που αντιστοιχεί σε μέγεθος 1000 βάσεων. Το αρνητικό control (6) δεν δούλεψε, που είναι και το επιθυμητό αποτέλεσμα.

3.2 Κλωνοποίηση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pSC-A και επιβεβαίωση της επιτυχίας με πέψη με περιοριστικά ένζυμα

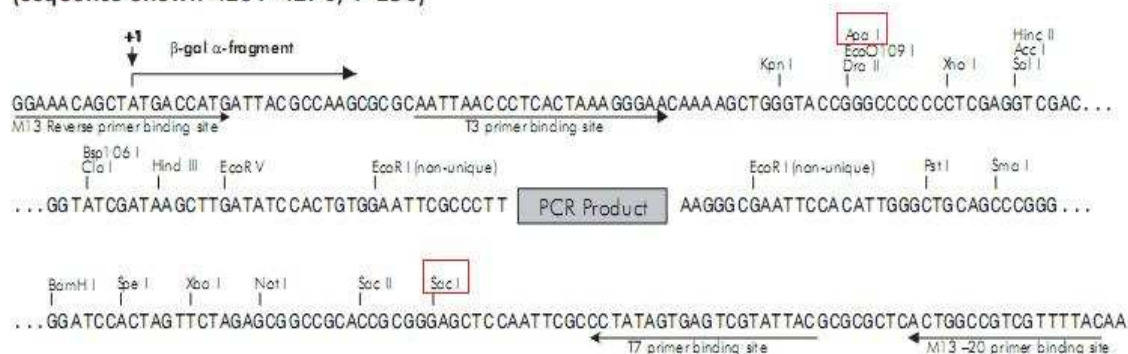
- Ακολούθησε ο καθαρισμός του PCR προϊόντος με το QIAPREP PCR Purification Kit (QIAGEN).
- Το PCR προϊόν κλωνοποιήθηκε με την χρήση του StrataCloneTM PCR Cloning Kit. Η διαδικασία περιλαμβάνει την ενσωμάτωση του γονιδίου μέσα

στον πλασμιδιακό φορέα pSC-A.

- Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μετασχηματίστηκε κατόπιν στα ειδικά δεκτικά κύτταρα του kit, τα οποία και αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες με στερεό θρεπτικό μέσο LB το οποίο περιείχε X-gal και αμπικιλίνη 100 µg/ml. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ήταν μπλε και άσπρου χρώματος, από τις οποίες ξεχωρίσαμε τις άσπρες.
- Στην συνέχεια απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από τις άσπρες αποικίες με το NucleoSpin Plasmid kit (MACHEREY NAGEL).



pSC-A-amp/kan PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region
(sequence shown 4261–4270, 1–250)

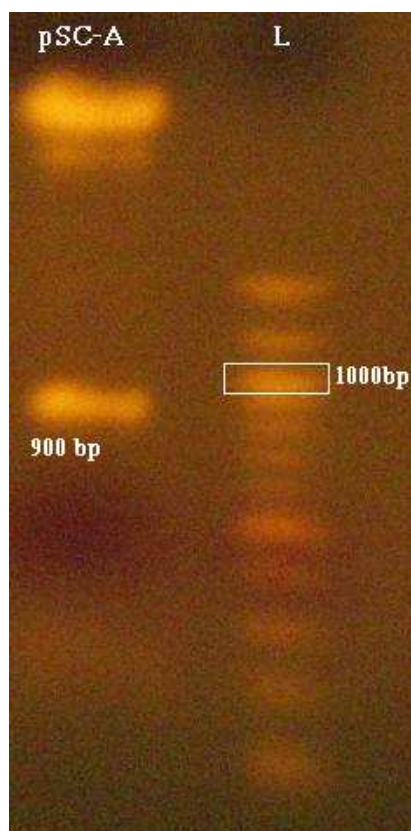


EIKONA 20: Ο πλασμιδιακός φορέας pSC-A του StrataCloneTM PCR Cloning Kit.

Σημειώνονται στην εικόνα οι θέσεις κοπής των περιοριστικών ενζύμων *Apa* I και *Sac* I, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κοπή του πλασμιδίου. Η κόκκινη περιοχή του πλασμιδίου αντιστοιχεί στην θέση όπου εισάχθηκε το ενισχυμένο με την PCR γονίδιο της ροδανάσης.

Για να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη του ενθέματος (γονίδιο ροδανάσης) στο πλασμιδιακό DNA των αποικιών, πραγματοποιήσαμε μια αντίδραση πέψης του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA με τα περιοριστικά ένζυμα *Apa* I και *Sac* I (New England Biolabs).

Η πέψη ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αгарόζης 0.8% στα 100V. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα και επιβεβαιώνουν την επιτυχία της κλωνοποίησης:



ΕΙΚΟΝΑ 21: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης της πέψης του πλασμιδίου pSC-A. Στην εικόνα φαίνεται μία ζώνη μεγέθους 900 βάσεων περίπου (810 bp το γονίδιο +

εκκινητές + νουκλεοτιδική αλληλουχία λόγω κοπής τους πλασμιδίου με τα περιοριστικά ένζυμα, αριστερά και δεξιά του PCR product) που αντιστοιχεί στο ένθεμα – γονίδιο της ροδανάσης και μία ζώνη αρκετά ψηλότερα που αντιστοιχεί στον pSC-A vector (4.3 kb). Συμπεραίνουμε ότι η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Σημειώνεται στην εικόνα η ζώνη του μάρτυρα ποριακού βάρους (Ladder, L) που αντιστοιχεί σε μέγεθος 1000 βάσεων.

3.3 Αλληλούχηση (sequencing)

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στάλθηκε στην εταιρία MacroGen (Κορέα) για αλληλούχηση. Η αλληλουχία που παραλάβαμε συγκρίθηκε με την αλληλουχία του γονιδίου της ροδανάσης (PSEEN4960) με την βοήθεια του εργαλείου βιοπληροφορικής BLASTN, το οποίο συγκρίνει αλληλουχίες νουκλεοτιδίων.

Από την σύγκριση διαπιστώθηκε ότι στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο η αλληλουχία του γονιδίου της ροδανάσης ήταν διαφορετική από την αλληλουχία PSEEN4960 κατά ένα μόλις νουκλεοτίδιο. Αυτή η αναντιστοιχία του ενός νουκλεοτιδίου πιθανώς οφείλεται στην δράση της Taq πολυμεράσης, της οποίας ο ρυθμός λάθους είναι περίπου 1 νουκλεοτίδιο ανά 9000.

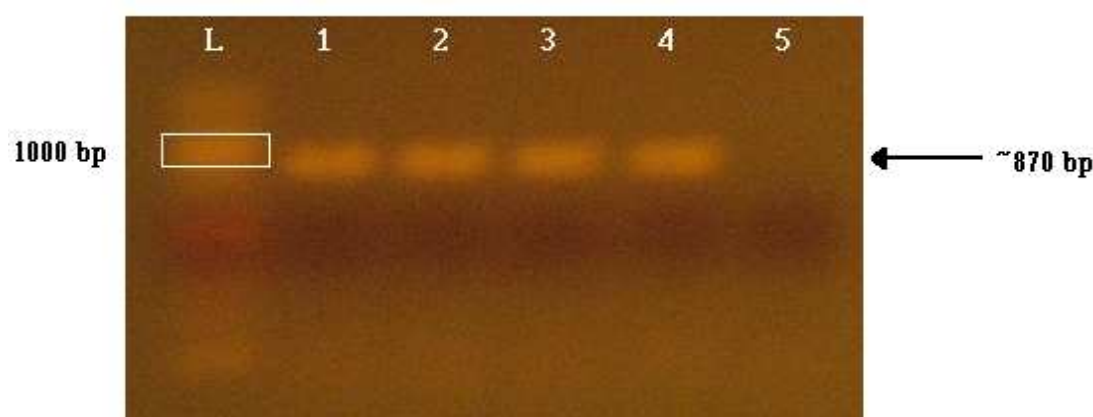
Το συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο αποτελούσε μέρος του κωδικονίου έναρξης του γονιδίου, που σημαίνει ότι θα προέκυπτε διαφορετικό αμινοξύ από την μεθειονίνη, άρα πιθανόν να άλλαζε η δραστηριότητα της ροδανάσης. Για να αποφύγουμε λοιπόν μελλοντικά προβλήματα στην έκφραση και στον βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου, αποφασίσαμε να επαναλάβουμε το πείραμα από την αρχή, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά υψηλής πιστότητας (High Fidelity) Taq πολυμεράση.

3.4 Ενίσχυση του γονιδίου της ροδανάσης με την τεχνική της PCR, με καινούριους primers και Taq πολυμεράση.

Το πείραμα ξεκίνησε από την αρχή, αυτή τη φορά με καινούρια, υψηλής πιστότητας πολυμεράση για να μειωθεί η πιθανότητα λάθους κατά την διάρκεια της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθώς και με καινούριους εκκινητές. Ως DNA μήτρα χρησιμοποιήθηκε χρωμοσωμικό DNA που απομονώθηκε από στερεές καλλιέργειες του άγριου τύπου *Pseudomonas entomophila*. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 150 μ L και το master mix μοιράστηκε σε 4 PCR tubes. Ένα 5ο tube περιείχε το αρνητικό (negative) control της αντίδρασης, στο οποίο δεν προστέθηκε DNA και

χρησιμοποιείται για να σιγουρευτούμε ότι δεν υπήρχε επιμόλυνση με ξένο DNA στο master mix .

Μετά την ολοκλήρωση της PCR έγινε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% στα 100V. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



ΕΙΚΟΝΑ 22: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR του γονιδίου της ροδανάσης. Και οι τέσσερις (1,2,3,4) αντιδράσεις έδωσαν ζώνες στο ίδιο μοριακό βάρος, το οποίο αντιστοιχεί στα 870 ζεύγη βάσεων περίπου (810 bp το γονίδιο και 29+28 bp οι εκκινητές). Σημειώνεται στην εικόνα η ζώνη του μάρτυρα ποριακού βάρους (Ladder, L) που αντιστοιχεί σε μέγεθος 1000 βάσεων. Το αρνητικό control (5) δεν δούλεψε, που είναι και το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Λόγω του ότι η PHUSION High Fidelity DNA Polymerase (FINNZYMES) αφήνει τυφλά (bland) άκρα στο PCR product, είναι απαραίτητη η προσθήκη μιας ουράς αδερίνης στο τμήμα DNA, ώστε να γίνει εφικτή η κλωνοποίησή του στον πλασμιδιακό φορέα του StrataCloneTM kit. Αυτό επιτυγχάθηκε με προσθήκη μικρής ποσότητας Taq πολυμεράσης (Hytest, UK) στο τελικό στάδιο επιμήκυνσης της PCR.

3.5 Κλωνοποίηση του γονιδίου της ροδανάσης

A. Κλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pSC-A

- Τα προϊόντα της PCR προστέθηκαν σε αποστειρωμένο eppendorf. Ολόκληρη η ποσότητα της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης. Ακολούθησε η εξαγωγή του γονιδίου από το πήκτωμα με την βοήθεια ξυραφιού και ο

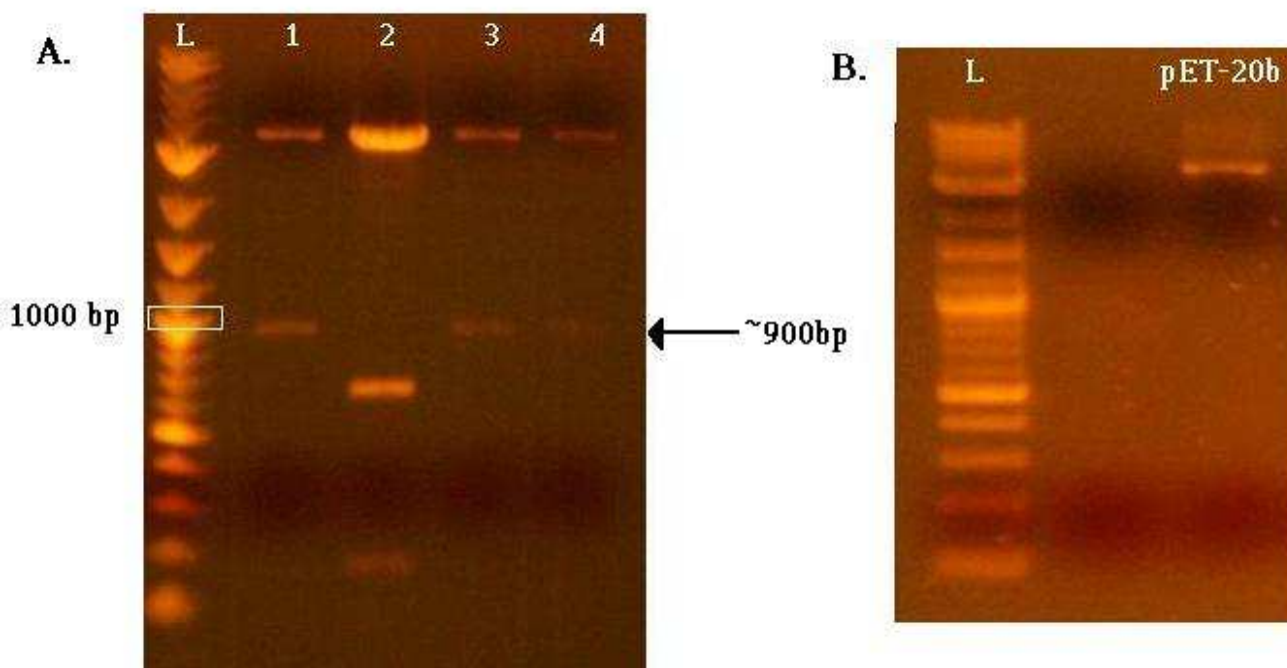
καθαρισμός του με το GEL EXTRACTION kit (QIAGEN).

- Πραγματοποιήθηκε η υποκλωνοποίηση του γονιδίου με την χρήση του StrataCloneTM PCR Cloning Kit. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (pSC-A φορέας + γονίδιο ροδανάσης) μετασχηματίστηκε στα ειδικά δεκτικά κύτταρα του kit, τα οποία αναπτύχθηκαν κατόπιν σε καλλιέργειες με στερεό θρεπτικό μέσο LB το οποίο περιείχε X-gal και αμπικιλίνη 100 µg/ml. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ήταν μπλε και άσπρου χρώματος, από τις οποίες ξεχωρίσαμε τις άσπρες.

B. Αντίδραση διπλής πέψης

- Απομονώθηκε στην συνέχεια το πλασμιδιακό DNA από άσπρες αποικίες με το NucleoSpin Plasmid kit (MACHEREY NAGEL).
- Ακολούθησε η διερευνητική πέψη του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA, προκειμένου να διαπιστωθεί ότι το πλασμίδιο έχει δεχθεί το ένθεμα. Έγινε χρήση των περιοριστικών ενζύμων BamH I και Hind III (NEB, New England Biolabs). Πραγματοποιήθηκαν 4 πέψεις, από το πλασμιδιακό DNA 4 διαφορετικών άσπρων αποικιών.
- Επίσης πραγματοποιήθηκε η πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET-20b(+) με τα ίδια ένζυμα περιορισμού, BamH I και Hind III.

Οι πέψεις ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 0.8% στα 100V. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.



ΕΙΚΟΝΑ 23: Α. Η πέψη πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από 4 διαφορετικές άσπρες αποικίες. Στα πλασμίδια #1, #3 και #4 το ένθεμα βρίσκεται στο σωστό μοριακό βάρος (περίπου 900 bp). Παρατηρούμε ότι το πλασμίδιο #2 δεν έχει λάβει το γονίδιο της ροδανάσης, αφού η ζώνη του ενθέματος είναι αρκετά μικρότερου μεγέθους από το επιθυμητό. Σημειώνεται στην εικόνα η ζώνη του μάρτυρα ποριακού βάρους (Ladder, L) που αντιστοιχεί σε μέγεθος 1000 βάσεων.

Β. Η πέψη του πλασμιδιακού φορέα pET-20b (3716 bp).

- Αφού διαπιστώθηκε η ύπαρξη του γονιδίου της ροδανάσης στο απομονωμένο πλασμιδιακό DNA, πραγματοποιήθηκε μια μεγάλη πέψη, χρησιμοποιώντας ολόκληρη την ποσότητα plasmid DNA μιας άσπρης αποικίας. Φορτώθηκε όλη η ποσότητα του προϊόντος της πέψης σε πηκτή αγαρόζης και ηλεκτροφορήθηκε στα 100V μέχρι να τρέξει αρκετά το δείγμα. Κατόπιν έγινε εξαγωγή του τμήματος DNA που αντιστοιχεί στο επιθυμητό γονίδιο με την βοήθεια ξυραφιού και καθαρισμός του με το GEL EXTRACTION kit (QIAGEN).
- Το προϊόν της πέψης του πλασμιδιακού φορέα pET-20b(+) καθαρίστηκε με την χρήση του QIAPREP PCR Purification Kit (QIAGEN).

B. Αντίδραση δεσμάσης (ligation)

Ακολούθησε η σύνδεση των μορίων του κομμένου και καθαρισμένου γονιδίου της ροδανάσης και του κομμένου και καθαρισμένου φορέα pET-20b(+), με την βοήθεια της T4 DNA λιγάσης (FERMENTAS).

Τα αποτελέσματα και η επιβεβαίωση της επιτυχίας της αντίδρασης της δεσμάσης φάνηκαν μετά το πέρας της διαδικασίας της ηλεκτροδιάτρησης. Στα τριβλία Petri, τα οποία επιστρώθηκαν με τα μετασχηματισμένα με το construct (pET-20b + γονίδιο ροδανάσης) βακτήρια DH5α, αναπτύχθηκε μία βακτηριακή αποικία παρουσία αμικιλίνης. Η αποικία ελέγχθηκε ως προς το πλασμιδιακό της DNA και επιβεβαιώθηκε τελικά η εισαγωγή του ενθέματος της ροδανάσης στον πλασμιδιακό φορέα (βλ. παρακάτω).

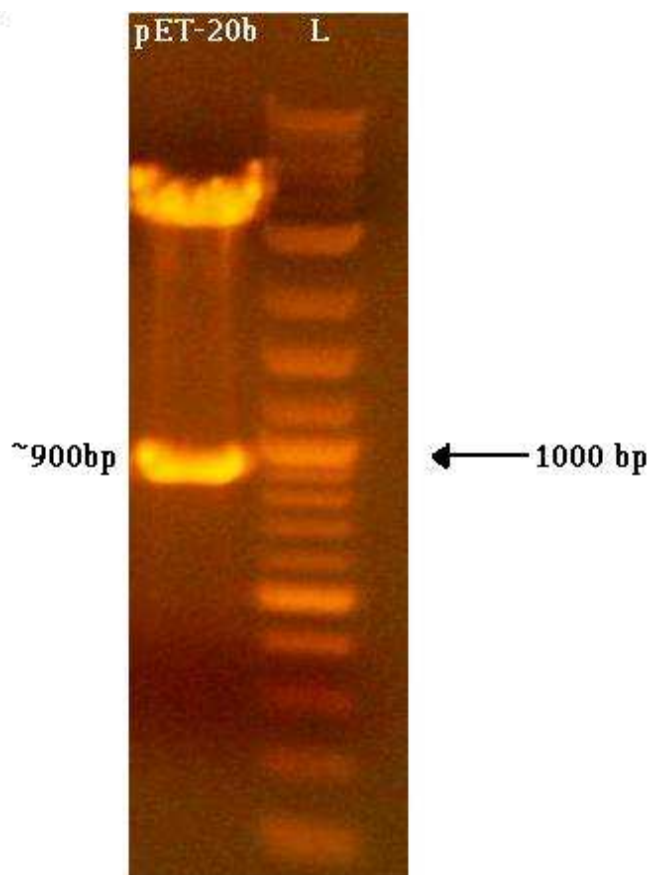
Γ. Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)

Ακολούθησε ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων DH5α μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τριβλία με LB άγαρ και αμικιλίνη 50 µg/ml και η ανάπτυξή τους πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37 °C για όλη την νύχτα. Η μοναδική αποικία που τελικά αναπτύχθηκε εμβολιάστηκε σε φρέσκο, αποστειρωμένο LB broth με αμικιλίνη 50 µg/ml και επωάστηκε overnight.

Δ. Επιβεβαίωση της επιτυχίας της κλωνοποίησης

Η επιτυχία του πειράματος της κλωνοποίησης του γονιδίου της ροδανάσης στον πλασμιδιακό φορέα pET-20b(+) επιβεβαιώθηκε με μια αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων DH5α.

- Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από υγρή καλλιέργεια της αποικίας χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin Plasmid (MACHEREY NAGEL).
- Το πλασμιδιακό DNA κατόπιν κόπηκε με την βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων BamH I και Hind III (NEB, New England Biolabs). Η πέψη ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% στα 100V. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



ΕΙΚΟΝΑ 24: Η πέψη του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από μετασχηματισμένα DH5α κύτταρα. Διακρίνεται η ζώνη μεγέθους περίπου 900bp που αντιστοιχεί στο ένθεμα – γονίδιο της ροδανάσης, καθώς και μία ζώνη αρκετά ψηλότερα, που αντιστοιχεί στον κομμένο φορέα pET-20b (3716bp). Σημειώνεται στην εικόνα η ζώνη του μάρτυρα ποριακού βάρους (Ladder, L) που αντιστοιχεί σε μέγεθος 1000 βάσεων.

3.6 Αλληλούχηση (sequencing)

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στάλθηκε στην Macrogen (Κορέα) για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου PSEEN4960 της *Pseudomonas entomophila* με την βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής BLASTN και έδειξαν 100% νουκλεοτιδική ταύτιση, πράγμα που επιβεβαίωσε την επιτυχία της κλωνοποίησης του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pET20b.

GACCTAGGCTGGAGATCGTGGATGACTGATTTTTCCGGCTTGCCCCCTGGTG
 ATCGAGCCTGCGGACCTGCTGCCGCGCCTGGATTCGCCACAGCTGATCCT
 GGTTCGACCTGACCAGCGTCAACCGCTATGGCAGCGGGCATATCCCCGGGG
 CCCGCTTCGTCGACCCGAAACGCACCCAGCTGGGCCAACCGCCAGCGCC
 GGGGCTGCTGCCAGCGCGTGCCGACCTGGAAAACTGTTTCGGTGAGCTC
 GGCCACCGCGACGACGCGGTCTATGTGGTCTACGACGACGAGGGTGGCGG
 CTGGGCCCGGACGCTTCATCTGGCTGCTCGACGTGATCGGCCACAAGGGCT
 ACCACTATCTCAATGGCGGCATTCAAGCCTGGCCGGCGGACAAGCTGTCC
 ACCGACACACCTGATATCGCCAATGGCCCCGGTGAGCCTGCACCTGCATGC
 CGAACCCACCGCCACCCGCGAATACCTGCAAAGCCGCTGGGGCGCCGCCG
 ACCTGGTTCATCTGGGACGCCCCGCGGGCCGCTGGAATACAGTGGCGAGAAA
 GTCCTGGCGGCCAAAGGCGGGCACATCCCCGGCGCGATCAACTTCGAATG
 GACCGCCGGCATGGACCTCAACGACCACCTGCGTATCCGCAAGGACATCG
 CCGATGTTCTGCAAAACCTGGGCATCACCCCGGACAAGGAAGTGATCACC
 CACTGCCAGACCCACCATCGCTCCGGCTTCACCTACCTCGTGGCCAAGCC
 CTCGGCTATCCACGGGTCAAGGCNTAGTCNNNCANNCCTTTCCNTTCGTGCT
 TTGTTAGCAGCCGGATCTCATTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 CG**GCAAGCTTACATGCGGGATTTCATTGAG**

EIKONA 25: Η αλληλουχία των βάσεων του γονιδίου που κλωνοποιήσαμε στον πλασμιδιακό φορέα pET-20b(+). Σε πράσινο πλαίσιο σημειώνεται ο forward εκκινητής PSEEN4960F2N και σε κόκκινο ο reverse εκκινητής PSEEN4960R2N. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία συγκρίθηκε με την αλληλουχία PSEEN4960 του γονιδιώματος της *Pseudomonas entomophila* με την βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής BLASTN και διαπιστώθηκε 100% νουκλεοτιδική ταύτιση.

3.7 Μετασχηματισμός BL21 (DE3) κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Ακολούθησε ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων BL21 μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τριβλία με LB άγαρ και αμπικλίνη 50 µg/ml και η ανάπτυξή τους πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37 °C για όλη την νύχτα. Παρασκευάστηκε stock γλυκερόλης των μετασχηματισμένων βακτηρίων.

3.8 Προσπάθεια υπερέκφρασης της πρωτεΐνης

A. Έλεγχος συνθηκών της υπερέκφρασης

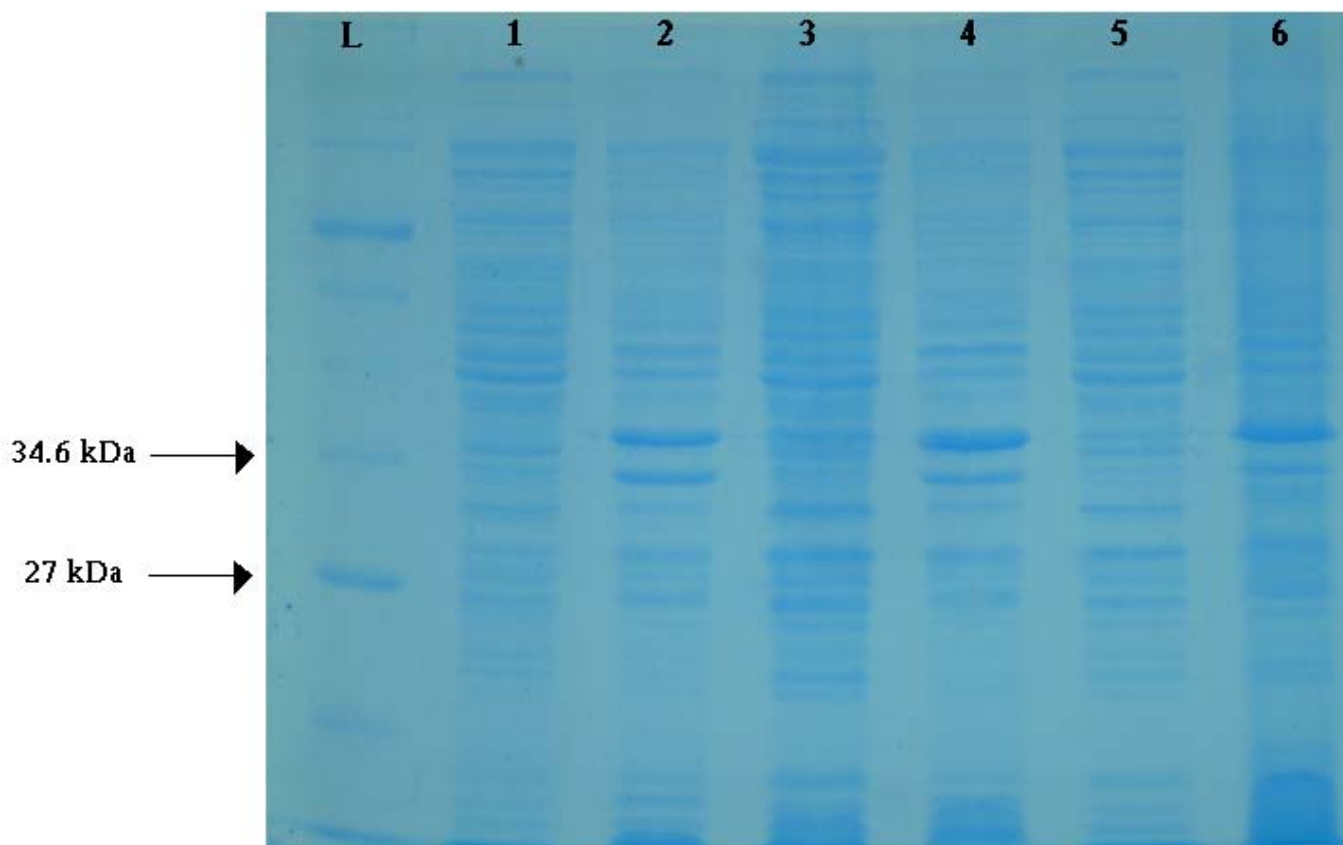
Μετασχηματισμένα BL21(DE3) βακτήρια αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό μέσο LB. Με προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης του επαγωγέα της μεταγραφής IPTG και υπό κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου επώασης, γίνεται η υπερέκφραση του γονιδίου-στόχου της ροδανάσης.

Το IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), προάγει την μεταγραφή του γονιδίου της ροδανάσης με τον εξής τρόπο: Στον πλασμιδιακό φορέα pET20b υπάρχει η ρυθμιστική περιοχή του οπερονίου της λακτόζης, που περιλαμβάνει 3 γονίδια: το I (repressor protein, αναστολέας), P (promoter, επαγωγέας) και O (operator, χειριστής). Κατά την μεταγραφή αυτής της κωδικοποιούσας περιοχής το γονίδιο I εκφράζει για την παραγωγή του αναστολέα, ο οποίος προσδένεται στον χειριστή κι έτσι η πρωτεΐνη δεν εκφράζεται. Προσθήκη της κατάλληλης συγκέντρωσης IPTG όμως προκαλεί την δέσμευση του IPTG πάνω στον αναστολέα και απομάκρυνσή του, με αποτέλεσμα την μεταγραφή του γονιδίου στόχου.

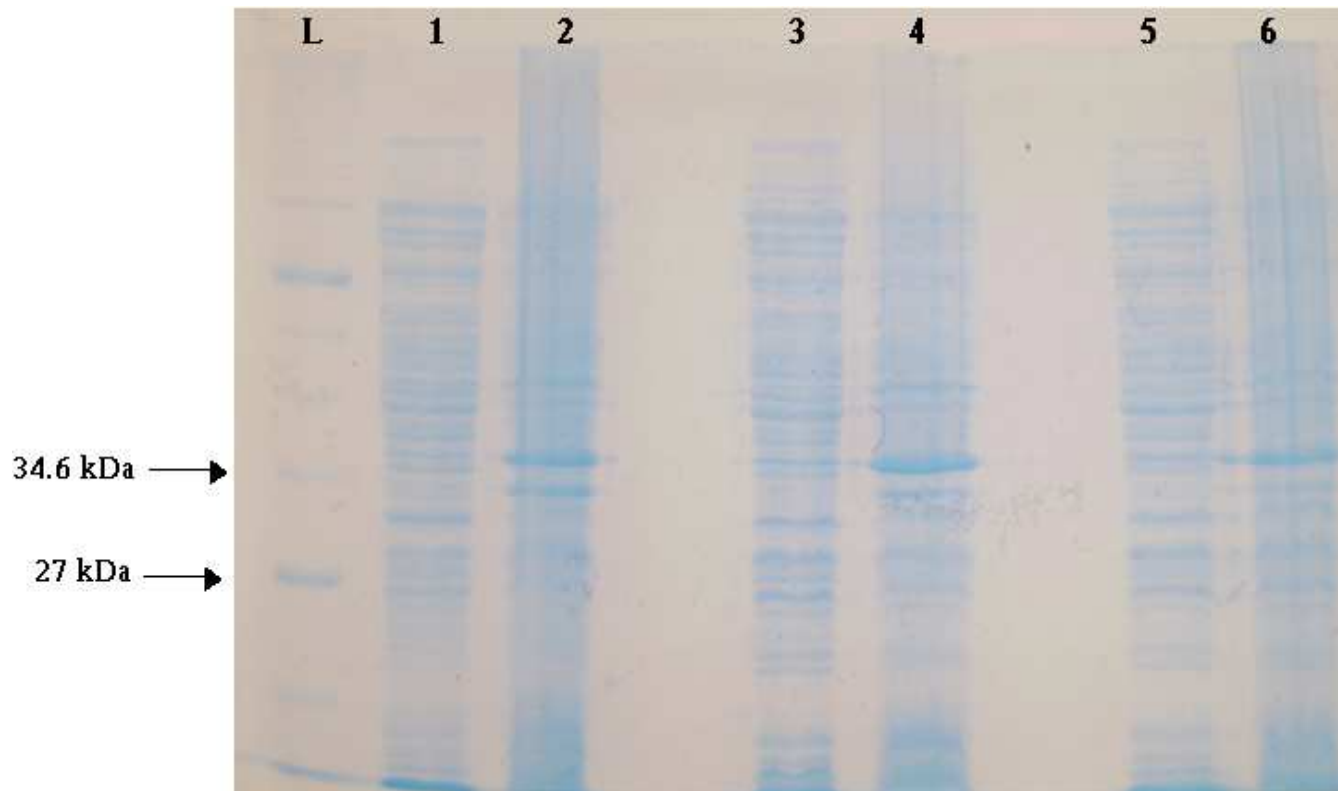
Με την παρούσα διαδικασία έγινε η προσπάθεια εύρεσης αυτών των συνθηκών, ώστε με γνωστές πλέον τις συνθήκες να γίνει μελλοντικά παραγωγή μεγάλης ποσότητας του ενζύμου και περαιτέρω μελέτη του. Μετά την λύση των κυττάρων με υπερήχους, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και διαχωρίστηκαν τα υπερκείμενα από τα ιζήματα. Ηλεκτροφορήσαμε τόσο τα υπερκείμενα όσο και τα ιζήματα σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδιου για να ελέγξουμε το αν η πρωτεΐνη “πέφτει” στο ίζημα.

Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στις παρακάτω εικόνες:

A.



B.



ΕΙΚΟΝΑ 26: Ηλεκτροφόρηση σε 12% SDS-PAGE των εκφραζόμενων πρωτεϊνών του

γονιδιώματος μετασχηματισμένων BL21 βακτηρίων.

A. Από αριστερά προς τα δεξιά: **L**, πρωτεϊνικός μάρτυρας (2-212 kDa, New England Biolabs). **1**, υπερκείμενο από το control μετά από επώαση 5 ωρών στους 37°C. **2**, ίζημα από το control μετά από επώαση 5 ωρών στους 37°C. **3**, υπερκείμενο από επώαση 5 ωρών στους 37°C, με 0.5 mM IPTG. **4**, ίζημα από επώαση 5 ωρών στους 37°C, με 0.5 mM IPTG. **5**, υπερκείμενο από επώαση 5 ωρών στους 37°C, με 1 mM IPTG. **6**, ίζημα από επώαση 5 ωρών στους 37°C, με 1 mM IPTG.

B. Από αριστερά προς τα δεξιά: **L**, πρωτεϊνικός μάρτυρας (2-212 kDa, New England Biolabs). **1**, υπερκείμενο από το control μετά από επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου. **2**, ίζημα από το control μετά από επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου. **3**, υπερκείμενο από επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου με 0.5 mM IPTG. **4**, ίζημα από επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου με 0.5 mM IPTG. **5**, υπερκείμενο από επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου με 1 mM IPTG. **6**, ίζημα από επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου με 1 mM IPTG.

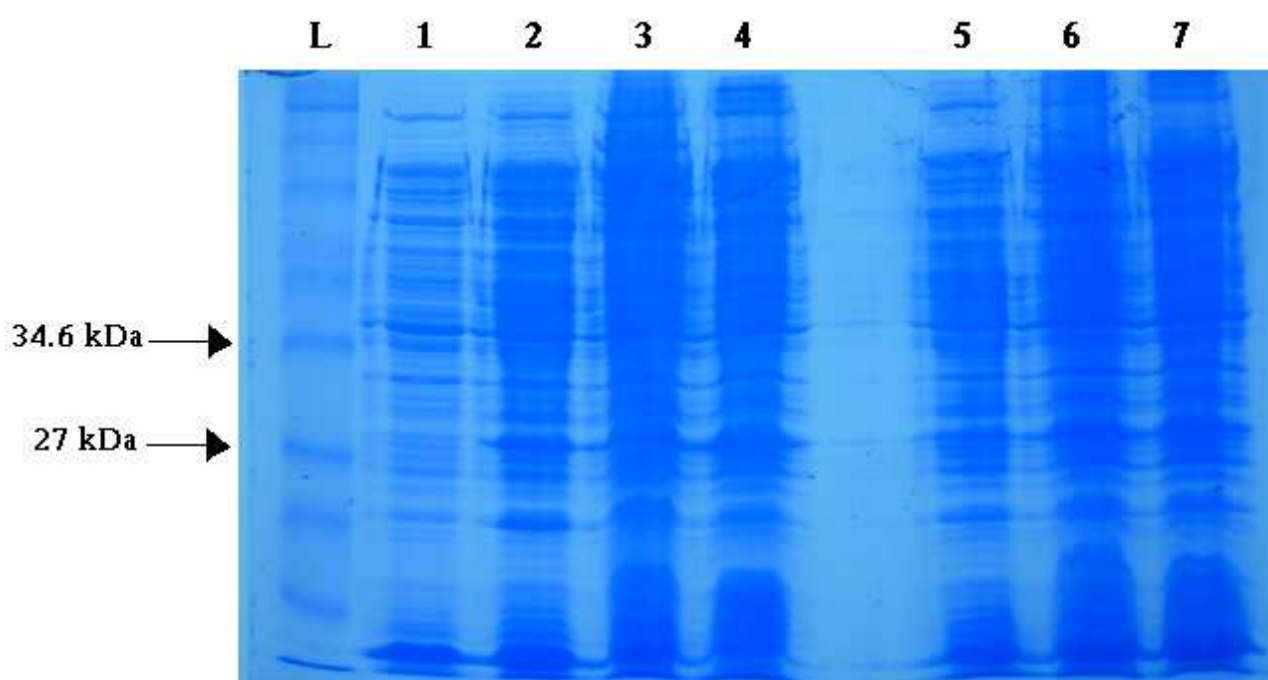
Σημειώνονται στην εικόνα οι ζώνες του μάρτυρα που αντιστοιχούν σε μεγέθη 27 και 34.6 kDa.

Η πρωτεΐνη PSEEN4960 έχει 270 αμινοξέα και το κάθε αμινοξύ έχει μοριακό βάρος 110 Da, οπότε υπολογίζουμε ότι η πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος $270 \times 110 = 29.7$ kDa. Περιμένουμε οπότε να δούμε μια πιο έντονη ζώνη (σε σχέση με τα control) μεταξύ των 2 αυτών ζωνών του μάρτυρα. Μετά από προσεκτική παρατήρηση των ζωνών υπερκειμένων και ιζημάτων μεταξύ αυτού του εύρους δεν εντοπίστηκε καμία διαφορά στο μέγεθος των ζωνών σε σχέση με τις αντίστοιχες των control. Συμπεράθηκε έτσι ότι οι συνθήκες της υπερέκφρασης που εφαρμόστηκαν δεν ήταν οι κατάλληλες για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης.

B. Έλεγχος της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης με εφαρμογή νέων συνθηκών

Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε, αυτή τη φορά με νέες συνθήκες. Τα ιζήματα αυτή τη φορά δεν ελέγχθηκαν. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 3 controls, ένα συνολικό control, χωρίς IPTG και χωρίς περεταίρω επώαση πέρα από την αρχική που είδαμε οπτική πυκνότητα 0.5, ένα χωρίς IPTG, που επώαστηκε στους 37 °C για όλη την νύχτα και ένα χωρίς IPTG, που επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για όλη την νύχτα.

Ηλεκτροφορήσαμε τα δείγματα σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



ΕΙΚΟΝΑ 27: Ηλεκτροφόρηση σε 12% SDS-PAGE των εκφραζόμενων πρωτεϊνών του γονιδιώματος μετασχηματισμένων BL21 βακτηρίων.

Από αριστερά προς τα δεξιά: **L**, πρωτεϊνικός μάρτυρας (2-212 kDa, New England Biolabs). **1**, Συνολικό control. **2**, control μετά από επώαση O/N στους 37 °C. **3**, υπερκείμενο από επώαση O/N στους 37 °C, με 0.5 mM IPTG. **4**, υπερκείμενο από επώαση 5 ωρών στους 37 °C, με 0.5 mM IPTG. **5**, control από επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου. **6**, υπερκείμενο από επώαση O/N σε θερμοκρασία δωματίου, με 0.5 mM IPTG. **7**, υπερκείμενο από επώαση 5 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, με 0.5 mM IPTG.

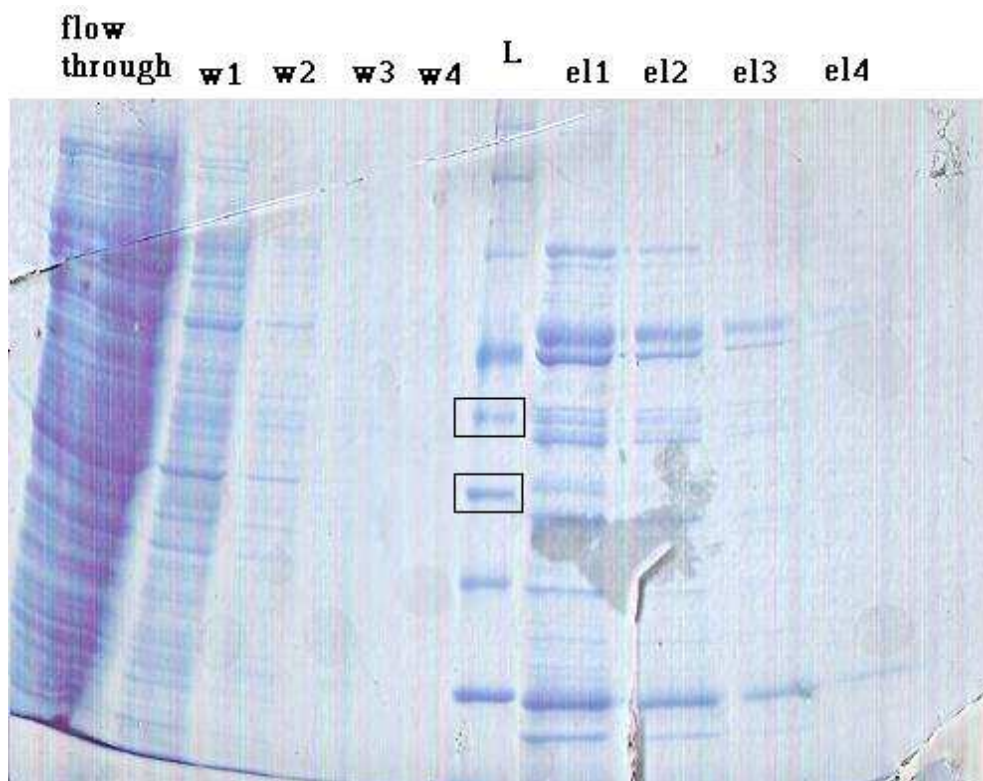
Σημειώνονται στην εικόνα οι ζώνες του μάρτυρα που αντιστοιχούν σε μεγέθη 27 και 34.6 kDa.

Εφόσον η πρωτεΐνη PSEEN4960 έχει μοριακό βάρος περίπου 29.7 kDa, περιμένουμε να δούμε μια πιο έντονη ζώνη (σε σχέση με τα control) μεταξύ των 2 αυτών ζωνών του μάρτυρα. Μετά από προσεκτική παρατήρηση των ζωνών μεταξύ αυτού του εύρους δεν εντοπίστηκε καμία διαφορά στο μέγεθος των ζωνών σε σχέση με τις αντίστοιχες των control. Συμπεράθηκε έτσι ότι οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν και πάλι δεν ήταν οι κατάλληλες για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης.

Γ. Καθαρισμός πρωτεΐνης με στήλη νικελίου και ανοσοαποτύπωση Western.

Ακολούθησε ο καθαρισμός των υπερκειμένων με χρήση στήλης νικελίου, σε μια προσπάθεια να απομονωθεί η πρωτεΐνη της ροδανάσης από το πλήθος των εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Η ροδανάση έχει στο C-καρβοξυτελικό της άκρο μια ουρά 6 ιστιδινινών (χάρη στην 6-His αλληλουχία του φορέα pET-20b), οι οποίες συνδέονται στα ιόντα νικελίου κι έτσι η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην στήλη, ενώ όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες περνάνε από το εσωτερικό της χωρίς να κατακρατούνται.

Ηλεκτροφορήσαμε σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% 4 πλύσεις της στήλης και 4 εκλούσεις της με ιμιδαζόλιο. Χρησιμοποιήθηκε ο πρωτεϊνικός μάρτυρας 2-212 kDa, της New England Biolabs. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



ΕΙΚΟΝΑ 28: Ηλεκτροφόρηση σε 12% SDS-PAGE του καθαρισμού της πρωτεΐνης με στήλη νικελίου. Στην εικόνα φαίνεται το flow-through, το οποίο περιέχει όλες τις πρωτεΐνες που δεν συγκρατήθηκαν από την στήλη. Φαίνονται επίσης οι πλύσεις (w1, w2, w3, w4) και οι εκλούσεις με ιμιδαζόλιο (el1, el2, el3, el4). Σημειώνεται στην εικόνα οι ζώνες στον πρωτεϊνικό μάρτυρα (L) που αντιστοιχούν στα μεγέθη 27 kDa και 34,6 kDa, μεταξύ του εύρους των οποίων περιμένουμε να βρίσκεται η ζώνη που αντιστοιχεί στην ροδανάση.

Παρατηρούμε την εμφάνιση πολλών ζωνών στις εκλούσεις, πράγμα που είναι ανεπιθύμητο καθώς θα έπρεπε να παρατηρήσουμε μόνο μία ζώνη, που θα αντιστοιχούσε στην πρωτεΐνη ροδανάση. Η εμφάνιση πολλών ζωνών σημαίνει ότι πολλές πρωτεΐνες με ιστιδίνες στο C-τελικό τους άκρο κατακρατήθηκαν από την στήλη νικελίου.

Με την ανοσοαποτύπωση τύπου Western που έγινε στην συνέχεια προσπαθούμε με την χρήση του αντισώματος Anti-His HRP να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει και δεσμεύεται στην πολυιστιδινική ουρά της πρωτεΐνης και παρουσία της 4-χλωροναφθόλης η οποία οξειδώνεται από το HRP δίνει ζώνες με χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα.

Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν την εμφάνιση κάποιας ζώνης στην μεμβράνη PVDF, παρά μόνο τις ζώνες που αντιστοιχούν στον μάρτυρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η *P.entomophila* έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα από τα λίγα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που έχει την ικανότητα σύνθεσης υδροκυανίου [Ryall et.al. 2009]. Το υδροκυάνιο είναι δευτερογενής μεταβολίτης με τοξική δράση η οποία εντοπίζεται στην αναπνευστική αλυσίδα, όπου δρα σαν καταστολέας του κυτοχρώματος c. Παράγεται κατά τη μετάβαση από την εκθετική φάση στη φάση στασιμότητας και τα βακτήρια που το παράγουν το εκκρίνουν και στο περιβάλλον τους. Η παραγωγή του απαιτεί μικροαεροφιλικές συνθήκες, γι' αυτό και είναι μεγαλύτερη στις στερεές καλλιέργειες της *P.entomophila* σε σχέση με τις υγρές.

Το υδροκυάνιο αποτελεί ένα σημαντικό τοξικό παράγοντα, που βοηθά τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* να επιβιώσουν στο περιβάλλον που αποικίζουν.

Η σύνθεσή του προσφέρει ένα σημαντικό πλεονέκτημα στους μικροοργανισμούς, οι οποίοι το χρησιμοποιούν για να ανταγωνιστούν τους θηρευτές που υπάρχουν στο ίδιο περιβάλλον, αλλά και για να παρασιτίσουν σε ξενιστές και να τους χρησιμοποιήσουν ώστε να μπορέσουν να επιβιώσουν. Το HCN αποτελεί έναν μολυσματικό παράγοντα που πιθανόν να συμβάλει στην εντομοπαθογένεια του βακτηρίου *Pseudomonas entomophila*.

Βακτήρια που εμφανίζουν εντομοπαθογένεια έχουν μελετηθεί από πολύ νωρίς, κυρίως ως προς τις στρατηγικές που έχουν αναπτύξει για να αλληλεπιδρούν με τα έντομα και να τα οδηγούν σε θάνατο. Έχει πραγματοποιηθεί η παρασκευή εντομοκτόνων με χρήση των γονιδιακών προϊόντων αυτών των βακτηρίων (ή ακόμη και των ίδιων των βακτηρίων), με σκοπό την καταπολέμηση εντόμων επιβλαβών για τις γεωργικές καλλιέργειες και εντόμων-φορέων ασθενειών που απειλούν ζωικούς οργανισμούς και τον άνθρωπο. Σημαντικό πρόβλημα αποτελεί ωστόσο η ανθεκτικότητα που αναπτύσσουν τα έντομα και η συνεπακόλουθη αναποτελεσματικότητα του εντομοκτόνου να σκοτώσει. Η εκτεταμένη χρήση για παράδειγμα του βακτηρίου *Bacillus thuringiensis* ως παρασιτοκτόνο σε γεωργικές καλλιέργειες, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων στις δ-ενδοτοξίνες του βακτηρίου. Επίσης η χρήση εντομοκτόνων έχει πιθανές σημαντικές επιπτώσεις και σε μη-επιβλαβή έντομα, τα οποία δρουν ως επικονιαστές φυτών. Επιπλέον, η πιθανή διείσδυση του εντομοκτόνου στην τροφική αλυσίδα μπορεί να αποτελέσει σοβαρό πρόβλημα σε πληθώρα οργανισμών του οικοσυστήματος αλλά και στον άνθρωπο.

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι είναι επιτακτική η ανάγκη δημιουργίας ενός μοντέλου για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παθογόνου, καθώς και για την ανάπτυξη τεχνικών βιοελέγχου των παρασιτικών εντόμων. Η *P. entomophila* είναι το μόνο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Pseudomonas*, που έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει παθογένεια στην *Drosophila melanogaster*. Η ικανότητα αυτή να μολύνει δια του στόματος και να σκοτώνει την *Drosophila melanogaster* καθώς και άλλα είδη εντόμων, όπως *Bombyx mori* και *Anopheles gambiae* [Isabelle Vallet-Gely et.al, 2009], την καθιστούν ένα πολλά υποσχόμενο μοντέλο μελέτης, με προοπτικές για πρακτικές εφαρμογές στην βιολογική καταπολέμηση εντόμων με μεγάλη οικονομική σημασία.

Τα κυανογενετικά βακτήρια έχουν αναπτύξει στρατηγικές για την προστασία τους από το υδροκυάνιο που τα ίδια παράγουν. Στο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει μια μη-ευαίσθητη στο κυάνιο οξειδάση (CIO), η οποία μπορεί και δρα επιτρέποντας στο βακτήριο να επιτελεί την αερόβια αναπνοή του ακόμα και στην παρουσία αυτού του πολύ ισχυρού αναστολέα οξειδασών. Η CIO θεωρείται το πιο αποτελεσματικό σύστημα για την προστασία του βακτηρίου *P.aeruginosa* από την τοξικότητα του εξωγενούς κυανίου. Παράλληλα, στα κυανογενετικά βακτήρια υπάρχει ένας επιπλέον μηχανισμός

αυτοπροστασίας τους από την τοξικότητα του κυανίου: ο καθαρισμός του υδροκυανίου από το ένζυμο ροδανάση.

Οι ροδανάσες είναι θειοτρανσφεράσες θειοθειικού ανιόντος ($S_2O_3^{2-}$) και κυανίου. Η δράση τους έγγειται στην κατάλυση της αντίδρασης μεταφοράς ενός ατόμου θείου από κατάλληλο δότη (θειοθειικό ανιόν) στο κυάνιο, με αποτέλεσμα την παραγωγή του λιγότερο τοξικού για τα βακτήρια θειοκυανίου (SCN) και την επίτευξη έτσι του καθαρισμού του ενδογενούς HCN κατά την ανάπτυξη υπό κυανογενετικές συνθήκες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εύρεση κάποιου γονιδίου που κωδικοποιεί για το ένζυμο ροδανάση στο βακτήριο *Pseudomonas entomophila*, συγκρίνοντας το γονιδιώμά του με αυτό των βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* και *Azotobacter vinelandii* και στην συνέχεια κλωνοποίηση αυτού του γονιδίου σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και υπερέκφραση της πρωτεΐνης.

Καταφέραμε και πραγματοποιήσαμε την κλωνοποίηση του γονιδίου PSEEN4960 της *Pseudomonas entomophila* στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pET20b(+) και τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E.Coli* του στελέχους BL21(DE3) με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Στην συνέχεια έγινε ο έλεγχος των κατάλληλων συνθηκών υπό τις οποίες υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη κατά την προκαρυωτική έκφραση. Εφαρμόστηκε πλήθος διαφορετικών συνθηκών: διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG, θερμοκρασίες και χρόνοι επώασης των βακτηρίων. Πραγματοποιήθηκε επίσης μια προσπάθεια καθαρισμού της πρωτεΐνης με χρήση στήλης νικελίου και ανίχνευσής της σε μεμβράνη PVDF με χρήση της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης τύπου WESTERN. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη δεν υπερεκφράζεται για λόγους που δεν είναι απόλυτα κατανοητοί.

Μελλοντικά, ο περεταίρω καθαρισμός και απομόνωση του ενζύμου σε μεγάλη κλίμακα θα οδηγήσει στον βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου και θα δώσει έτσι τις απαραίτητες πληροφορίες για την δράση του ενζύμου, ώστε να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του στην αυτοπροστασία του βακτηρίου *P.entomophila* από το υδροκυάνιο. Ο απώτερος στόχος είναι η κατασκευή του μοντέλου κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης της ροδανάσης της *P.entomophila*, κάτι το οποίο έχει επιτευχθεί μέχρι στιγμής μόνο για το βακτήριο *Azotobacter vinelandii* [Bordo et.al. 2000].

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Aminlari, M., A. Li, V. Kunanithy, and C. H. Scaman. 2002.** Rhodanese distribution in porcine (*Sus scrofa*) tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* **132**:309–313.
- **Aminlari, M., and M. Shahbazi. 1994.** Rhodanese (thiosulfate:cyanide sulfurtransferase) distribution in the digestive tract of chickens. *Poult. Sci.* **73**:1465–1469.
- **Blumer C, Heeb S, Pessi G, Haas D. 1999.** Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *PNAS* **96**: 14073-8.
- **Blumer C. and Haas, D. 2000.** Mechanism, regulation and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol* **173**: 170-177
- **Bordo, D. & Bork, P. (2002).** The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-Structure-function relations. *EMBO reports*, *vol. 3/no. 8*, pp741-746
- **Bordo, D., Deriu, D., Colnaghi, R., Carpen, A., Pagan, S. & Bolognesi, M. (2000).** The Crystal Structure of a Sulfurtransferase from *Azotobacter vinelandii*

Highlights the Evolutionary Relationship between the Rhodanese and Phosphatase Enzyme Families. *J. Mol. Biol.* 298, 691-704

- **Brock**, Biology of Microorganisms, 10th edition, 2005
- **Castric P.A, (1977)** Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *J Bacteriol* **130**:826-831
- **Cipollone, R., Bigotti, M.G., Frangipani, E., Ascenzi, P., Viscaa, P. (2004).** Characterization of a rhodanese from the cyanogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**, 85–90
- **Cipollone, R., Frangipani, E., Tiburzi, F., Imperi, F., Ascenzi, P. & Visca, P. (2007).** Involvement of *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanese in Protection from Cyanide Toxicity. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. **73**, No. **2** p. 390–398
- **Comolli, J. C. & Donohue, T. J. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Mol Microbiol* **45**, 755–768.
- **Cooper, M., Tavankar, G.R. & Williams, H.D. (2003).** Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**, 1275–1284
- **Cunningham, L., Pitt, M. & Williams, H. D. (1997).** The *cioAB* genes from *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome bd quinol oxidases. *Mol Microbiol* **24**, 579–591.
- **Fujiwara, T., Fukumori, Y. & Yamanaka, T. (1992).** A novel terminal oxidase, cytochrome *baa3* purified from aerobically grown *Pseudomonas aeruginosa*: it shows a clear difference between resting state and pulsed state. *J Biochem* **112**, 290–298.
- **Garau, J., Gomez, L., (2003),** *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, *Curr.Opin. Infect. Dis.* **16** 135–143.
- **Junemann, S. (1997).** Cytochrome bd terminal oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1321**, 107–127.
- **Lapouge, K., M. Schubert, F. H. Allain, and D. Haas. 2008.** Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* **67**:241-53.
- **Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, Gaia V, Dufago G, Keel C, Haas D (1998)** Characterization of the *hcnABC* gene cluster en-coding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent

- **Liehl, P., M. Blight, N. Vodovar, F. Boccard, and B. Lemaitre. 2006.** Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. *PLoS Pathog* **2**:e56.
- **Marahiel, M. A., T. Stachelhaus, and H. D. Mootz. 1997.** Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev* **97**:2651-2674.
- **Ploegman, J.H. , Drent, G. , Kalk, K.H. , Hol, W.G.J. ,Hienrikson, R.L. , P. Keim, L. Weng, J. Russell (1978),** The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese, *Nature* **273** 124–129
- **Poole, R. K. & Cook, G. M. (2000).** Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons and regulation. *Adv Microb Physiol* **43**, 165–224.
- **R. Colnaghi, S. Pagani, C. Kennedy, M. Drummond. 1996.** Cloning, sequence analysis and overexpression of the rhodanese gene of *Azotobacter vinelandii*, *Eur. J. Biochem.* **236** (1996) 240–248.
- **Ray, W. K., G. Zeng, M. B. Potters, A. M. Mansuri, and T. J. Larson. 2000.** Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* **182**:2277–2284.
- **Ryall B., Mitchell H., Mossialos D., Williams H.D, (2009)** Cyanogenesis by the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila*, *Lett Appl Microbiol* **49**: 131-135
- **Stachelhaus, T., H. D. Mootz, and M. A. Marahiel. 1999.** The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**:493-505.
- **Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L. & 28 other authors (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964.
- **Sylvester, M., and C. Sander. 1990.** Immunohistochemical localization of rhodanese. *Histochem. J.* **22**:197–200.
- **Vallet-Gely, I. , Novikov, A. , Augusto, L. , Liehl, P. , Bolbach, G., Pichy-Tarr, M. , Cosson, P., Keel, C., Caroff, M. and Lemaitre, B. (2009).** Hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, is linked to cyclic lipopeptide production. *Appl. Environ. Microbiol.*doi:**10.1128/AEM.02112-09**
- **Vodovar N., Vallenet D., Cruveiller S., Rouy Z., Barbe V., Acosta C., Cattolico L., Jubin C., Lajus A., Segurens B., Vacherie B., Wincker P., Weissenbach J., Lemaitre B., Medigue C., Boccard F., (2006).** Complete

genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol* **24**: 673-679

- **Vodovar N., Vinals M., Liehl P., Basset A., Degrouard J., Spellman P., Boccard F., Lemaitre B., (2005).** *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *PNAS* **102**: 11414-11419
- **Westley, J., Adler, H., L. Westley, C. Nishida (1983),** The sulfurtransferases, *Fundam. Appl. Toxicol.* **3** 337–382.
- **Yang, S., Q. Peng, Q. Zhang, X. Yi, C. J. Choi, R. M. Reedy, A. O. Charkowski, and C. H. Yang. 2008.** Dynamic regulation of GacA in type III secretion, pectinase gene expression, pellicle formation, and pathogenicity of *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937). *Mol Plant Microbe Interact* **21**:133-42.
- **Zlosnik, J.E.A., Tavankar, G.R., Bundy, J.G., Mossialos, D., O'Toole, R. & Williams, H.D. (2006).** Investigation of the physiological relationship between the cyanide-insensitive oxidase and cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **152**, 1407–1415